

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA MENDES NADAL

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
IN VITRO E *IN VIVO* DE SISTEMAS POLIMÉRICOS CONTENDO
ÁCIDO FERÚLICO**

CURITIBA

2016

JESSICA MENDES NADAL

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
IN VITRO E *IN VIVO* DE SISTEMAS POLIMÉRICOS CONTENDO
ÁCIDO FERÚLICO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Warumby Zanin

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

JESSICA MENDES NADAL

Título: "DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

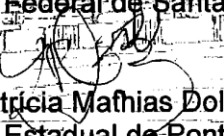

Prof.ª Dr.ª Sandra Maria Warumby Zanin
Orientadora


Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Co-orientador


Prof.ª Dr.ª Daniela Florencio Maluf
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Universidade Federal do Paraná


Prof.ª Dr.ª Letícia Cruz
Universidade Federal de Santa Maria


Prof.ª Dr.ª Patricia Mathias Doll Boscardin
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 03 de março de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado a minha mãe, Marjorie Bitencourt Emilio Mendes (*in memoriam*), a maior incentivadora de meus estudos, pelo exemplo de bondade, caráter, coragem e tantas outras qualidades que fazem me orgulhar de ser sua filha. Por ter dedicado a sua vida de forma incondicional para a minha formação pessoal e profissional.

Posso ver o brilho nos seus olhos, sentir o tom de sua voz de felicidade e orgulho
e o seu lindo sorriso!

Saudades... muitas saudades!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin, pela oportunidade concedida para a realização deste doutorado e principalmente pela confiança em mim depositada desde o momento em que nos conhecemos. Sempre terei pela senhora uma profunda admiração pessoal, profissional e sincero apreço.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por ser o meu grande mestre, e o exemplo que procuro seguir. Obrigada por conceder o Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos e Farmácia Industrial para a realização deste trabalho; por toda a sabedoria transmitida, confiança, paciência, dedicação incansável e admirável competência intelectual. As palavras não são capazes de expressar todo o meu sentimento de gratidão. Espero, um dia, poder retribuir ao menos um pouco por tudo o que me ensinou e fez por mim. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas.

À Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo apoio e colaboração nos ensaios de cultivo celular. Sua serenidade, paciência e competência profissional são qualidades admiráveis.

À Profa. Dra. Sônia Faria Zawadzki do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração nas análises térmicas.

Ao Dr. Milton Domingos Michél, pela realização das análises em microscopia eletrônica de varredura.

À Profa. Dra. Yasmine Mendes Pupo da Universidade Federal do Paraná, minha querida irmã, pela qual tenho uma profunda admiração e respeito por todas as inúmeras qualidades pessoais e profissionais. Hoje, mais do que nunca, você é a

minha referência e suporte para seguir em frente. Que a nossa união seja fortalecida a cada dia.

À técnica da Central Analítica da Universidade Federal do Paraná, Maria da Graça Teixeira de Toledo, pela sincera amizade, sempre com palavras de incentivo e pelo auxílio na realização do desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, que sempre me atenderam com muito respeito, pela ajuda no decorrer deste trabalho, em especial, à Elizabete Munhoz, à Luzia Chaves Simão e Luciane Mendes.

Às pós-graduandas, Débora Maria Borsato, Mona Lisa Simionatto Gomes e Martinha Antunes de Almeida pelo auxílio com os ensaios *in vivo* da atividade antiagregante plaquetária.

Às colegas de doutorado Gerusa Halila Possagno, Daniela Gaspardo Folquitto, Vanessa Jasisnki e Mona Lisa Simionatto Gomes que me davam carona durante as viagens semanais entre Ponta Grossa e Curitiba.

Aos colegas do laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos e Farmácia Industrial da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pelo convívio agradável.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por permitir esta oportunidade de crescimento técnico-científico.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Aos ilustríssimos professores membros das bancas de qualificação e de defesa, por terem gentilmente aceitado o convite em participar deste momento tão importante e pelas valiosas contribuições prestadas.

Ao Senhor Pedro Zanin, pelo carinho e receptividade demonstrada a cada encontro.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste estudo.

Ao meu esposo Thiago Nadal por todo suporte emocional, carinho e amor que sempre dedicou a mim. Pela companhia constante, paciência infinita e por compreender a minha ausência em tantos momentos.

À minha filha amada, Sophia Mendes Nadal, um anjo enviado por Deus, gerada e concebida durante o desenvolvimento deste doutorado e que veio com o propósito de iluminar o meu caminho quando eu me encontrava na completa escuridão. Você é a razão da minha vida! Te amo infinitamente!

**“Sonhe com o que você quiser,
vá para onde você queira ir.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só temos uma chance
de fazer aquilo que queremos.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce,
dificuldades para fazê-la forte,
tristeza para fazê-la humana
e esperança suficiente para fazê-la feliz.”**

Clarice Lispector

RESUMO

As micropartículas contendo ácido ferúlico foram obtidas a partir dos polímeros poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e poli- ϵ -caprolactona pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente (sistema S1) e empregando o processo de secagem por aspersão, a partir do polímero metacrílico Eudragit[®] L100 (sistema S2). As dispersões sólidas de ácido ferúlico foram preparadas pelo método de secagem por aspersão, a partir dos polímeros PVP-K30, PEG 6000 e poloxâmero 188 (sistema S3). O método analítico para a determinação do ácido ferúlico nas formulações foi validado conforme o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *The International Conference on Harmonization* empregando formulações do sistema S1. Os sistemas poliméricos S2 e S3 foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos e o mecanismo de liberação *in vitro* do fármaco foi estudado a partir do ensaio de dissolução, avaliando os perfis de liberação por métodos modelo-independentes e modelo-dependentes. A estabilidade do ácido ferúlico à radiação ultravioleta e a possível formação de produtos de degradação foram investigadas. O efeito antioxidante *in vitro* das dispersões sólidas (sistema S3) foi investigado pelo método de descoloração do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico). As formulações de micropartículas do sistema S2 foram submetidas a estudos *in vitro* baseados em células. A avaliação biológica das formulações (sistemas S2 e S3) e do fármaco puro foi conduzida empregando modelo *in vivo* de atividade antiagregante plaquetária. Para o sistema S1, um método simples e eficiente de cromatografia líquida de alta eficiência/arranjo de fotodiodos foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa do ácido ferúlico nas micropartículas poliméricas (eficiência de encapsulação acima de 98%). A avaliação da estabilidade demonstrou que o ácido ferúlico sofre fotodegradação por meio de uma cinética de segunda ordem. No sistema S2, as micropartículas resultaram em formulações micrométricas, estáveis termicamente e não cristalinas/amorfas com alta eficiência de encapsulação. Ligações de hidrogênio intermoleculares entre o ácido ferúlico e o Eudragit[®] L100 foram detectadas por infravermelho com transformada de Fourier. As formulações reduziram estatisticamente a taxa de dissolução do fármaco, mantendo o modelo cinético monoexponencial. A microencapsulação do ácido ferúlico promoveu um efeito citoprotetor contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e inibiu a agregação plaquetária estimulada por colágeno. Para o sistema S3, as dispersões sólidas contendo ácido ferúlico preparadas utilizando o PEG 6000 apresentaram rendimentos adequados, baixos teores de água, alto teor de fármaco, baixa cristalinidade e interação fármaco-polímero reduzida. As formulações de PVP K-30 revelaram alto teor de água, enquanto que as de poloxâmero 188 demonstraram baixo teor de fármaco e cristais de ácido ferúlico na superfície. Todas as formulações aumentaram a solubilidade relativa e a taxa de dissolução do fármaco. A formulação PEG 6000 + ácido ferúlico 10% demonstrou atividade antioxidante *in vitro* apropriada e um efeito *in vivo* antiplaquetário estatisticamente significativo, quando comparada com o controle e com o fármaco puro.

Os resultados sugerem que as micropartículas poliméricas e dispersões sólidas contendo ácido ferúlico (sistemas S2 e S3) são estratégias viáveis para a administração por via oral, sendo alternativas interessantes como antioxidantes e destinadas ao tratamento de eventos trombóticos.

Palavras-chave: Agregação plaquetária. Antioxidante. Citoproteção. Dispersões sólidas. Micropartículas poliméricas.

ABSTRACT

Microparticles containing ferulic acid was obtained from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly- ϵ -caprolactone (PCL) by single emulsion/solvent evaporation method (system S1) and from a methacrylic polymer (Eudragit[®] L100) by spray-drying (system S2). Solid dispersions of ferulic acid were prepared by spray-drying using PVP-K30, PEG 6000 and poloxamer 188 (system S3). The analytical method for determination of ferulic acid in these formulations was validated as recommended by the Brazilian health agency and The International Conference on Harmonization using formulations from system S1. Polymeric systems S2 and S3 were characterized by morphological, spectroscopic and thermal analyses. The mechanism of *in vitro* release of ferulic acid was studied after dissolution test for systems S2 and S3. The release profiles were fitted by model-independent and model-dependent methods. The stability of ferulic acid was investigated against ultraviolet radiation and the related degradation products were studied. *In vitro* antioxidant effect of solid dispersions (system S3) was assayed by 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization. Formulations of methacrylic microparticles containing ferulic acid (system S2) were evaluated by *in vitro* cell-based studies for determination of cytotoxicity, cytoprotective potential, nitric oxide production and effect on generation of reactive oxygen species. Biological study of formulations from systems S2 and S3 was carried out using *in vivo* model of anti-platelet activity. For system S1, a simple and efficient reverse-phase HPLC-DAD method was developed and validated for quantitative determination of ferulic acid into polymeric microparticles. High encapsulation efficiency was obtained (higher than 98%). In summary, the method found to be specific, linear, accurate, precise, and robust for a rapid determination of this drug. It can be used for studying stability and degradation of ferulic acid that occurred by a second order kinetics. For system S2, microparticles of Eudragit[®] L100 containing ferulic acid were successfully prepared by spray-drying. Micrometer-sized, heat-stable and amorphous/non-crystalline formulations with high drug-loading efficiencies were obtained. Intermolecular hydrogen bonding between ferulic acid and Eudragit[®] L100 were recorded by FTIR. Formulations provided a statistical decrease in the dissolution rate of ferulic acid and maintained the initial monoexponential kinetic model. In addition, microencapsulation of ferulic acid provided cytoprotection against H₂O₂-induced oxidative stress and inhibited collagen-stimulated platelet aggregation. For system S3, solid dispersions containing ferulic acid were successfully prepared by spray-drying using PVP K-30, PEG 6000 and poloxamer 188 as carriers. PEG 6000 formulations presented suitable yield, low water content, high drug loading, low drug crystallinity and reduced drug-polymer interaction. PVP K-30 formulations showed high water content whereas poloxamer 188 solid dispersions had several disadvantages as low drug content and crystals of ferulic acid. All formulations enhanced relative solubility and dissolution rate of ferulic acid. The chosen spray-dried formulation (PEG 6000 + 10% ferulic acid) demonstrated suitable *in vitro* antioxidant activity and a statistically significant *in vivo* anti-platelet effect compared to control and pure drug. These results

obtained for systems S2 and S3 support an experimental basis for the use of polymeric microparticles and spray-dried solid dispersions containing ferulic acid as feasible oral drug delivery intended to present antioxidant effect and for treating thrombotic events.

Keywords: Antioxidant. Cytoprotective. Platelet aggregation. Polymeric microparticles. Solid dispersions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	MODELOS DE ESTRUTURA DAS MICROPARTÍCULAS.....	34
FIGURA 2 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DO PHB E DO PHBV.....	37
FIGURA 3 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DA PCL.....	38
FIGURA 4 –	ESTRUTURA QUÍMICA DO EUDRAGIT® L100.....	39
FIGURA 5 –	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FERÚLICO.....	44
FIGURA 6 –	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA.....	52
FIGURA 7 –	ESQUEMA DE FORMAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DO SISTEMA S1 (M1 E M2) CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO PELO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO.....	54
FIGURA 8 –	ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DO SISTEMA S2 CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO.....	55
FIGURA 9 –	REAÇÃO DE REDUÇÃO DO RADICAL ABTS POR UM ANTIOXIDANTE.....	68
FIGURA 10 –	REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT A CRISTAS DE FORMAZAN.....	69
FIGURA 11 –	CROMATOGRAMA DE CLAE CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE ÁCIDO FERÚLICO (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). FASE MÓVEL: ÁGUA AJUSTADA PARA PH 3,0 USANDO ÁCIDO <i>ORTHO</i> - FOSFÓRICO 0,1 N E METANOL (52:48 v/v); FLUXO: 1,0 mL.min^{-1} ; COMPRIMENTO DE ONDA DE DETECÇÃO: 320 nm; TEMPERATURA DA COLUNA: 25 ± 2 °C E VOLUME DE INJEÇÃO: 10 μL	77
FIGURA 12 –	CROMATOGRAMAS ($\lambda = 320$ nm) DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1 PREPARADAS SEM O FÁRMACO: M1AF0 (A), M2AF0 (B); EM COMPARAÇÃO COM O DAS MICROPARTÍCULAS QUE CONTÉM O ÁCIDO FERÚLICO:	

	M1AF10 (C) E M2AF10 (D).....	78
FIGURA 13 –	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO OBTIDA POR CLAE NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 10 A 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n = 3).....	79
FIGURA 14 –	CROMATOGRAMAS OBTIDO APÓS UMA HORA DE EXPOSIÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO SOB CONDIÇÕES ÁCIDAS (A) E ALCALINAS (B).....	82
FIGURA 15 –	AJUSTE GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES REMANESCENTES DE ÁCIDO FERÚLICO <i>VERSUS</i> TEMPO PARA AS EQUAÇÕES DE ORDEM ZERO (a), PRIMEIRA ORDEM (b), E SEGUNDA ORDEM (c) NO ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO.....	84
FIGURA 16 –	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÁCIDO FERÚLICO PURO (a), DO PHBV (b) E DA PCL (c) POR MEV, AUMENTO DE 1200 X.....	86
FIGURA 17 –	FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA M1 OBTIDAS POR MEV, AUMENTO DE 1200 X, M1AF0 (a), M1AF5 (b), M1AF10 (c) E M1AF20 (d).....	87
FIGURA 18 –	FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA M2 OBTIDAS POR MEV, AUMENTO DE 1200 X, M2AF0 (a), M2AF5 (b), M2AF10 (c) E M2AF20 (d).....	89
FIGURA 19 –	DIFRATOGRAMAS DO ÁCIDO FERÚLICO, DO PHBV, DA MISTURA FÍSICA E DAS MICROPARTÍCULAS S1M1.....	90
FIGURA 20 –	DIFRATOGRAMAS DO ÁCIDO FERÚLICO, DA PCL, DA MISTURA FÍSICA E DAS MICROPARTÍCULAS S1M2.....	91
FIGURA 21 –	DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA OBTIDA PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2, M1AF0 (a), M1AF5 (b), M1AF10 (c), M1AF20 (d).....	93
FIGURA 22 –	DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA OBTIDA PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2, M2AF0 (a), M2AF5 (b), M2AF10 (c), M2AF20 (d).....	94

FIGURA 23 – ESPECTROS IVTF DO PHBV, ÁCIDO FERÚLICO (AF), DA MISTURA FÍSICA (MF) E DAS MICROPARTÍCULAS M1AF0, M1AF5, M1AF10 E M1AF20.....	96
FIGURA 24 – ESPECTROS IVTF DA PCL, ÁCIDO FERÚLICO (AF), DA MISTURA FÍSICA (MF) E DAS MICROPARTÍCULAS M2AF0, M2AF5, M2AF10 E M2AF20.....	96
FIGURA 25 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÁCIDO FERÚLICO PURO (a) (AUMENTO DE 1200 X) E DO EUDRAGIT® L100 (b) (AUMENTO DE 270 X) POR MEV.....	100
FIGURA 26 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2 OBTIDAS POR MEV, AUMENTO DE 2400 X, M3AF0 (a), M3AF5 (b), M3AF10 (c) E M3AF20 (d).....	102
FIGURA 27 – ESPECTROS IVTF DO AF, DO POLÍMERO DE PARTIDA EUDRAGIT® L100, DA MISTURA FÍSICA (MF) (AF:EUDRAGIT® L100, 1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS M3AF0, M3AF5, M3AF10 E M3AF20 QUE INTEGRAM O SISTEMA S2.....	105
FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DO AF, DO POLÍMERO DE PARTIDA EUDRAGIT® L100, DA MISTURA FÍSICA (MF) (AF: EUDRAGIT® L100, 1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS M3AF0, M3AF5, M3AF10 E M3AF20 QUE INTEGRAM O SISTEMA S2.....	106
FIGURA 29 – CURVAS DE ATG DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2: M3AF0 (a), M3AF5 (b), M3AF10 (c) E M3AF20 (d).....	107
FIGURA 30 – TERMOGRAMAS OBTIDOS POR CED DO ÁCIDO FERÚLICO, DO EUDRAGIT® L100, DA MISTURA FÍSICA (MF) (AF: EUDRAGIT® L100, 1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS M3AF0, M3AF5, M3AF10 E M3AF20 QUE INTEGRAM O SISTEMA S2.....	108
FIGURA 31 – PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FÁRMACO PURO E DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2.....	109
FIGURA 32 – RESULTADOS DO ENSAIO DE CULTIVO CELLULAR <i>IN VITRO</i> PARA O ÁCIDO FERÚLICO PURO E A FORMULAÇÃO	

M3AF10 USANDO A LINHAGEM CELLULAR J774A.1. **A** VIABILIDADE CELULAR AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO. **B** EFEITO CITOPROTETOR CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR H₂O₂. **C** PRODUÇÃO DE NO INDUZIDA POR LPS EM CÉLULAS J774A.1 MENSURADA APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO. **D** PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS J774A.1 UTILIZANDO A SONDA DE FLUORESCÊNCIA DCFH-DA. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA (n = 6). OS ASTERISCOS INDICAM NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE: SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, **p* < 0,05, ***p* < 0,01 AND ****p* < 0,001, TESTE POST HOC DE TUKEY..... 114

FIGURA 33 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DA FORMULAÇÃO M3AF0 (CONTROLE), DA FORMULAÇÃO M3AF10 E DA ASPIRINA. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA A PARTIR DE 8 ENSAIOS INDEPENDENTES. OS ASTERISCOS INDICAM OS NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA COMPARADO AO CONTROLE: SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, **p* < 0,05 E ***p* < 0,01, TESTE DE BONFERRONI..... 116

FIGURA 34 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÁCIDO FERÚLICO PURO (a) (AUMENTO DE 1200 X) E DOS POLÍMEROS PVP-K30 (b), PEG 6000 (c) E PLX-188 (d) POR MEV, AUMENTO DE 240 X.. 122

FIGURA 35 – MICROGRAFIAS DAS DISPERSÕES SÓLIDAS OBTIDAS POR MEV, PREPARADAS POR SECAGEM POR ASPERSÃO, AUMENTO DE 500 X, PVP-K30 10% (a), PVP-K30 20% (b), PEG 6000 10% (c), PEG 6000 20% (d), PLX-188 10% (e) E PLX-188 20% (f)..... 123

FIGURA 36 – DIFRATOGRAMA DO ÁCIDO FERÚLICO (AF), PVP-K30 (a), PEG 6000 (b), PLX-188 (c), MISTURA FÍSICA (MF), E DISPERSÕES SÓLIDAS PREPARADAS POR SECAGEM POR

	ASPERSÃO DO SISTEMA S3.....	126
FIGURA 37 –	ESPECTROS IVTF DO ÁCIDO FERÚLICO (AF), DO PVP-K30, DO PEG 6000, DO PLX-188, DA MISTURA FÍSICA (MF) E DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3.....	128
FIGURA 38 –	CURVAS DE ATG DAS DISPERSÕES SÓLIDAS PREPARADAS POR SECAGEM POR ASPERSÃO DO SISTEMA S3: PVP-K30 (a), PEG 6000 (b) E PLX-188 (c).....	131
FIGURA 39 –	PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FÁRMACO PURO E DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3.....	133
FIGURA 40 –	EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FERÚLICO PURO E DA DISPERSÃO SÓLIDA PEG 6000 10% PELA DESCOLORAÇÃO DO RADICAL CATIONICO ABTS ^{•+} : a) t = 0 min, b) t = 30 min E c) t = 60 min.....	138
FIGURA 41 –	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DA FORMULAÇÃO PEG 6000 0% (CONTROLE), DO ÁCIDO FERÚLICO PURO, DA FORMULAÇÃO PEG 6000 10% E DA ASPIRINA. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA A PARTIR DE 8 EXPERIÊNCIAS INDEPENDENTES. OS ASTERISCOS INDICAM NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA EM RELAÇÃO AO CONTROLE: SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, *** $p < 0,001$, TESTE DE BONFERRONI.....	140

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DO PHBV E DA PCL (SISTEMA S1M1 E S1M2).....	53
TABELA 2 –	COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DO POLÍMERO METACRÍLICO EUDRAGIT® L100 (SISTEMA S2).....	56
TABELA 3 –	COMPOSIÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO PREPARADAS PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO (SISTEMA S3).....	57
TABELA 4 –	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO POR CLAE.....	59
TABELA 5 –	RENDIMENTO* OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES DOS SISTEMAS S1M1 E S1M2, A PARTIR DO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE.....	74
TABELA 6 –	TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ÁCIDO FERÚLICO, PARA O PHBV, PARA A PCL E PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1 (M1 E M2).....	75
TABELA 7 –	VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE EXATIDÃO*	80
TABELA 8 –	VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	81
TABELA 9 –	VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE ROBUSTEZ (n = 3).....	81
TABELA 10 –	TEOR* DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV E DE PCL (mg.g ⁻¹) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE, %).....	85

TABELA 11 –	DIÂMETRO MÉDIO E <i>SPAN</i> ¹ (DISPERSÃO GRANULOMÉTRICA) PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1 (M1 E M2), INDICANDO O TEOR ² DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO EM CADA MATERIAL.....	92
TABELA 12 –	RENDIMENTO* OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES DO SISTEMA S2, A PARTIR DO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO.....	95
TABELA 13 –	TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ÁCIDO FERÚLICO, PARA O EUDRAGIT [®] L100 E PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2.....	98
TABELA 14 –	TEOR ¹ DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT [®] L100 (mg.g ⁻¹) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO ² (EE, %).	99
TABELA 15 –	TEOR DE ÁGUA ¹ , TEOR DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS ¹ , EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) ² , DIÂMETRO MÉDIO ¹ , E <i>SPAN</i> PARA AS MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT [®] L100 DO SISTEMA S2.....	103
TABELA 16 –	RESULTADOS DA MODELAGEM MATEMÁTICA PELA EQUAÇÃO MONOEXPONENCIAL PARA O ÁCIDO FERÚLICO PURO E PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2.....	111
TABELA 17 –	RENDIMENTO E TEOR DE FÁRMACO OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES DO SISTEMA S3.....	118
TABELA 18 –	TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ÁCIDO FERÚLICO, PARA OS POLÍMEROS DE PARTIDA (PVP-K30, PEG 6000 E PLX-188) E PARA AS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3.....	119
TABELA 19 –	RESULTADOS DA MODELAGEM MATEMÁTICA PELA EQUAÇÃO BIEXPONENCIAL PARA O ÁCIDO FERÚLICO PURO E PELA EQUAÇÃO DE WEIBULL PARA AS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	- 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
a e b	constantes que incorporam as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica
A e B	concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução na equação biexponencial
α e β	constante cinética de dissolução para a equação biexponencial
AF	ácido ferúlico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O/A	emulsão múltipla água em óleo em água
A_t	área total
ATG	análise termogravimétrica
B	coeficiente angular
β -CD	β -ciclodextrina
HP β CD	hidroxipropil- β -ciclodextrina
CED	calorimetria exploratória diferencial
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	coeficiente de variação percentual
DCM	diclorometano
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
$d_{(v,10)}$	diâmetro das partículas correspondente a 10% da distribuição acumulada

$d_{(v,50)}$	diâmetro das partículas correspondente a 50% da distribuição acumulada
$d_{(v,90)}$	diâmetro das partículas correspondente a 90% da distribuição acumulada
ED	eficiência de dissolução
FO	fase orgânica
ft	fração do fármaco dissolvido no tempo t
IC ₅₀	concentração necessária do antioxidante para suprimir 50% do agente oxidante
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IVTF	infravermelho com transformada de Fourier
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k	constante cinética de dissolução para as equações monoexponencial e de ordem zero
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
MSC	critério de seleção do modelo
n	número de repetições
n	expoente de liberação
O/A	emulsão óleo em água
O/O	emulsão óleo em óleo
PCL	poli(ϵ -caprolactona)

p.f.	ponto de fusão
PGA	poli(ácido glicólico)
pH	potencial hidrogeniônico
PHAs	poli(hidroxiálcanoatos)
PHB	poli(3-hidroxibutirato)
PHBV	poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVAI	poli(álcool vinílico)
PVP	poli(vinilpirrolidona)
r	coeficiente de correlação
sistema S1	micropartículas contendo ácido ferúlico, formuladas pelo método de emulsão/evaporação do solvente orgânico, a partir do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e a partir da poli(ϵ -caprolactona
sistema S2	micropartículas contendo ácido ferúlico, formuladas pelo método de secagem por aspersão, a partir do polímero (met)acrílico Eudragit [®] L 100
sistema S3	dispersões sólidas contendo ácido ferúlico, formuladas pelo método de secagem por aspersão
<i>span</i>	dispersão granulométrica
t	tempo
T_d	tempo no qual 63,2% do fármaco está dissolvido
T_g	temperatura de transição vítrea
Tween [®] 80	polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
UV	radiação ultravioleta

UV-Vis espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

y porcentagem de fármaco dissolvido no tempo t

$\%D$ porcentagem de dissolução

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	33
3.1	MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	33
3.1.1	Poli(hidroxibutirato) e Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato).....	36
3.1.2	Poli(ϵ -caprolactona).....	37
3.1.3	Polímero Metacrílico Eudragit® L100.....	38
3.2	DISPERSÕES SÓLIDAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.....	40
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO ÁCIDO FERÚLICO.....	44
3.4	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO O ÁCIDO FERÚLICO.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	EQUIPAMENTOS.....	48
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	49
4.2.1	Fármaco.....	49
4.2.2	Polímeros.....	49
4.2.3	Água Purificada.....	50
4.2.4	Reagentes e Meios Usados no Cultivo Celular	50
4.2.5	Outros Reagentes e Solventes.....	50
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	51
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	53
4.4.1	Obtenção dos Sistemas Poliméricos.....	53
4.4.1.1	Sistema S1: micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico, obtidas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente orgânico, a partir dos polímeros poli(3-hidroxibutirato-co-3- hidroxivalerato) (PHBV) e poli- ϵ -caprolactona (PCL).....	53

4.4.1.2	Sistema S2: micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico, preparadas pelo método de secagem por aspersão, a partir do polímero metacrílico Eudragit® L 100.....	55
4.4.1.3	Sistema S3: dispersões sólidas contendo ácido ferúlico formuladas pelo método de secagem por aspersão.....	56
4.4.1.4	Misturas físicas.....	57
4.4.2	Rendimento.....	58
4.4.2.1	Sistema S1.....	58
4.4.2.2	Sistema S2.....	58
4.4.2.3	Sistema S3.....	58
4.4.3	Determinação do Teor de Umidade.....	58
4.4.4	Determinação do Ácido Ferúlico Incorporado nos Sistemas Poliméricos.....	59
4.4.4.1	Validação do método analítico para a quantificação do ácido ferúlico.....	59
4.4.4.2	Estudo de degradação forçada.....	61
4.4.4.3	Eficiência de encapsulação.....	62
4.4.5	Estudo de Solubilidade.....	62
4.4.6	Caracterização Físico-química dos Sistemas Poliméricos.....	63
4.4.6.1	Análises morfológicas e de superfície.....	63
4.4.6.2	Determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica.....	63
4.4.6.3	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho.....	64
4.4.6.4	Análise por difração de raios X.....	64
4.4.6.5	Análise térmica.....	64
4.4.7	Estudo de Liberação <i>In Vitro</i>	65
4.4.7.1	Avaliação dos perfis de liberação.....	65
4.4.8	Estudo do Potencial Antioxidante.....	67
4.4.9	Ensaio <i>In Vitro</i> de Cultivo Celular.....	68
4.4.9.1	Cultivo celular.....	68
4.4.9.2	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.....	69
4.4.9.3	Ensaio de citoproteção.....	70

4.4.9.4	Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	70
4.4.9.5	Ensaio para a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS).....	71
4.4.10	Ensaio <i>In Vivo</i> da Atividade Antiagregante Plaquetária.....	71
4.4.10.1	Animais.....	72
4.4.10.2	Protocolo experimental.....	72
4.4.10.2.1	Sistema S2.....	72
4.4.10.2.2	Sistema S3.....	72
4.4.10.3	Preparação de plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP).....	73
4.4.10.4	Teste de agregação plaquetária.....	73
4.4.10.5	Análise estatística.....	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	SISTEMA S1: MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO, OBTIDAS PELO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO, A PARTIR DOS POLÍMEROS POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO) (PHBV) E POLI-E-CAPROLACTONA (PCL).....	74
5.1.1	Rendimento.....	74
5.1.2	Determinação do Teor de Umidade.....	75
5.1.3	Determinação do Ácido Ferúlico Incorporado nas Micropartículas e Eficiência de Encapsulação.....	76
5.1.3.1	Desenvolvimento e otimização do método analítico.....	76
5.1.3.2	Validação do método analítico para a quantificação do ácido ferúlico.....	78
5.1.3.3	Estudo de degradação forçada.....	82
5.1.3.4	Eficiência de encapsulação.....	83
5.1.4	Análises Morfológicas e de Superfície.....	85
5.1.5	Determinação do Tamanho de Partícula e da Dispersão Granulométrica.....	91
5.1.6	Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	95

5.2	SISTEMA S2: MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO, PREPARADAS PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO, A PARTIR DO POLÍMERO METACRÍLICO EUDRAGIT® L 100.....	97
5.2.1	Rendimento.....	97
5.2.2	Determinação do Teor de Umidade.....	98
5.2.3	Determinação do Ácido Ferúlico e Eficiência de Encapsulação.....	99
5.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	100
5.2.5	Determinação do Tamanho de Partícula e da Dispersão Granulométrica.....	103
5.2.6	Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	104
5.2.7	Difração de Raios X.....	105
5.2.8	Análise Térmica.....	107
5.2.8.1	Análise termogravimétrica (ATG)	107
5.2.8.2	Calorimetria exploratória diferencial (CED).....	108
5.2.9	Estudo de Liberação <i>In Vitro</i>	109
5.2.10	Ensaio <i>In Vitro</i> de Cultivo Celular.....	111
5.2.11	Ensaio <i>In Vivo</i> da Atividade Antiagregante Plaquetária.....	115
5.3	SISTEMA S3: DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO FORMULADAS PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO.....	117
5.3.1	Rendimento.....	117
5.3.2	Determinação do Teor de Umidade.....	118
5.3.3	Estudo de Solubilidade.....	119
5.3.4	Teor de Fármaco.....	120
5.3.5	Análises Morfológicas e de Superfície.....	121
5.3.6	Difração de Raios X.....	124
5.3.7	Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	127
5.3.8	Análise Termogravimétrica.....	130
5.3.9	Estudo de Liberação <i>In Vitro</i>	131
5.3.10	Estudo do Potencial Antioxidante.....	136
5.3.11	Ensaio <i>In Vivo</i> da Atividade Antiagregante Plaquetária.....	138
6	CONCLUSÕES	140

REFERÊNCIAS.....	142
APÊNDICE 1 – MANUSCRITO 1: A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency.....	157
APÊNDICE 2 – MANUSCRITO 2: Spray-dried Eudragit® L100 microparticles containing ferulic acid: formulation, <i>in vitro</i> cytoprotection and <i>in vivo</i> anti-platelet effect.....	179
APÊNDICE 3 – MANUSCRITO 3: Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: comparative analysis of three carriers, <i>in vitro</i> dissolution, antioxidant potential and <i>in vivo</i> anti-platelet effect	212
ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	247

1 INTRODUÇÃO

O ácido ferúlico ou ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico (AF; $C_{10}H_{10}O_4$; PM: 194,18 Da) é um composto químico extremamente abundante no reino vegetal, que tem baixa toxicidade e é sintetizado a partir da via do chiquimato, a partir da fenilalanina ou da L-tirosina. Na natureza, ocorre principalmente como isômero *E* (SONG et al., 2014; WANG et al., 2011; ITAGAKI et al., 2009). Considerando suas propriedades físico-químicas e biológicas, o ácido ferúlico apresenta solubilidade aquosa de $6,63 \text{ mg.dL}^{-1}$ em pH 7,2 (SAIJA et al., 2000), uma meia-vida de 42 min (ZHAO, 2008) e um coeficiente de partição octanol/água (log P) de 1,67 (ROLEIRA, 2010).

Estudos anteriores demonstraram que o AF tem várias utilizações terapêuticas, incluindo efeitos como anti-inflamatório, antioxidante, antitrombótico, anti-câncer, neuroprotetor e cardioprotetor. Quando aplicado na pele, tem uma atividade foto-protetora (ZHANG et al., 2015; MERLIN et al., 2012; STANIFORTH et al., 2012; WANG et al., 2011; DU; CAO; YU, 2010; YU et al., 2010). Esse composto polifenol também apresenta propriedades que estão relacionadas com a inibição de enzimas citotóxicas, associadas à inflamação, incluindo a óxido nítrico-sintase induzida, as caspases e a ciclo-oxigenase-2. Essas propriedades contribuem para o seu potencial antioxidante e seu efeito anti-inflamatório (MANCUSO & SANTANGELO, 2014; STANIFORTH et al., 2012; ANSELMi et al., 2008; ANSELMi et al., 2006).

A capacidade antioxidante do AF é possivelmente devida a três características estruturais diferentes. Em particular, à presença do hidrogênio lábil pertencente ao grupo fenólico, formando um sistema totalmente conjugado, que envolve o anel aromático, à ligação dupla e a carbonila do ácido carboxílico, confere propriedades relevantes em termos de efeito antioxidante, por conduzir a formação de produtos estáveis de menor energia. A presença da insaturação na cadeia lateral proporciona sítios para o ataque por radicais livres (ITAGAKI et al., 2009). Além disso, o grupo ácido carboxílico pode permitir uma interação com a bicamada lipídica da membrana celular que fornece proteção contra a peroxidação lipídica (VASHISTH et al., 2015; ITAGAKI et al., 2009; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

Apesar das atividades biológicas e efeitos bioquímicos do AF, a sua utilização terapêutica é restrita, devido a algumas propriedades físico-químicas, tais como a baixa solubilidade aquosa (SAIJA et al., 2000). O AF tem uma natureza hidrofóbica, pode oxidar-se, e é um composto fotossensível que resulta na conversão parcial do isômero *E* para *Z* (ANSELMi et al., 2008). Nesse sentido, a sua biodisponibilidade é geralmente diminuída, conduzindo a um efeito mínimo *in vivo* por administração oral (WANG et al., 2011).

Por causa dessas propriedades físico-químicas inadequadas, sistemas poliméricos de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos a fim de melhorar a estabilidade, aumentar a biodisponibilidade e/ou potencializar o efeito biológico do AF. A quitosana e o AF foram submetidos a uma reação de acoplamento mediada pela carbodiimida para melhorar a sua atividade antioxidante e a solubilidade em água (WORANUCH & YOKSAN, 2013). Complexos de inclusão entre o AF e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) foram preparados pelo método de liofilização e forneceram uma maior solubilidade e uma estabilidade elevada para o AF (WANG et al., 2011). Nanopartículas lípicas sólidas de ácido esteárico- e estearil ferulato contendo *E*-AF promoveram uma absorção facilitada pelas células devido à sua estrutura lipofílica, que acarretou em uma melhora na biodisponibilidade do AF (TROMBINO et al., 2013). Nanopartículas de PLGA preparadas pelo método de emulsão dupla aumentaram as propriedades anticâncer *in vitro* em relação às células NCI-H460 em comparação com o AF puro (MERLIN et al., 2012). Apesar dos estudos citados, a literatura não relata estudos envolvendo micropartículas poliméricas e/ou dispersões sólidas contendo AF para melhorar os seus efeitos citoprotetores e antioxidantes. Além disso, nenhum trabalho anterior investigou o efeito desses sistemas poliméricos sobre a atividade antiplaquetária do AF.

Dessa forma, considerando a necessidade de otimizar o potencial terapêutico do ácido ferúlico, torna-se interessante o uso de formulações capazes de estabilizar esse fármaco, preservando suas atividades biológicas e aumentando a sua biodisponibilidade. Nesse sentido, o desenvolvimento de sistemas de liberação imediata ou controlada desse fitofármaco, como dispersões sólidas e micropartículas poliméricas, respectivamente, pode ser uma estratégia viável e promissora para a busca de melhores respostas antioxidantes e antiplaquetárias.

Frente ao exposto, o propósito deste estudo foi promover o desenvolvimento tecnológico, a caracterização e a avaliação de três diferentes sistemas poliméricos contendo ácido ferúlico, destinados à administração oral, para proporcionar uma alteração na liberação do fármaco, a fim de otimizar suas propriedades biológicas como antioxidante, citoprotetor e antiplaquetário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Obter, caracterizar e avaliar *in vitro* e *in vivo* micropartículas poliméricas e dispersões sólidas contendo ácido ferúlico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico, a partir dos poliésteres biodegradáveis, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), pelo método da emulsão simples/evaporação do solvente orgânico (sistema S1);
- Preparar micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico, empregando o processo de secagem por aspersão, a partir do polímero metacrílico Eudragit® L100 (sistema S2);
- Produzir dispersões sólidas contendo ácido ferúlico, a partir do PVP-K30, PEG 6000 ou poloxâmero 188, utilizando o método de secagem por aspersão (sistema S3);
- Proceder a determinação quantitativa do ácido ferúlico presente nos sistemas poliméricos pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação/incorporação do fármaco;
- Efetuar a caracterização dos sistemas poliméricos por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas (sistemas S2 e S3);
- Investigar a estabilidade do ácido ferúlico frente à radiação ultravioleta e à possível formação de produtos de degradação;
- Avaliar a liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas poliméricos S2 e S3, empregando o ensaio de dissolução;
- Comparar os perfis de liberação das formulações dos sistemas S2 e S3 com o fármaco puro, por meio de métodos matemáticos modelo-independentes e modelo-dependentes;

- Estudar o efeito antioxidante *in vitro* das formulações do sistema S3 pelo método de descoloração do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico);
- Desenvolver estudos *in vitro* de cultivo celular, para a determinação da citotoxicidade, citoproteção, produção de óxido nítrico e efeito na geração de espécies reativas de oxigênio a partir das formulações de micropartículas metacrílicas contendo ácido ferúlico (sistema S2);
- Avaliar biologicamente as formulações dos sistemas S2 e S3 frente ao fármaco puro, empregando o modelo *in vivo* de atividade antiagregante plaquetária.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

As tecnologias de liberação modificada de fármacos representam uma das áreas mais promissoras da ciência, com o objetivo de contribuir à saúde humana e animal, oferecendo diversas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais. Dessa forma, a investigação de sistemas de liberação, que incluem a modulação do processo de dissolução, a redução da toxicidade e o aumento da adesão e da conveniência do paciente, torna-se de extrema importância (RESTANI et al., 2010). Além disso, essas estratégias podem tornar os fármacos mais disponíveis em alvos específicos, para produzir um melhor efeito terapêutico (EVANGELISTA, 2006).

O desenvolvimento dessas formas farmacêuticas, capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime posológico, além de promover o controle da liberação de ativos em sítios específicos, tem sido o objetivo de diferentes pesquisas nos últimos anos. Dentre os principais sistemas utilizados, incluem-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (MAINARDES, 2007).

Neste contexto, as micropartículas poliméricas têm sido bastante estudadas, pois são capazes de promover a liberação modificada de fármacos a partir de uma ampla variedade de materiais poliméricos e de diversos métodos de obtenção (TRAN; BENOÎTA; VENIER-JULIENNEA, 2011).

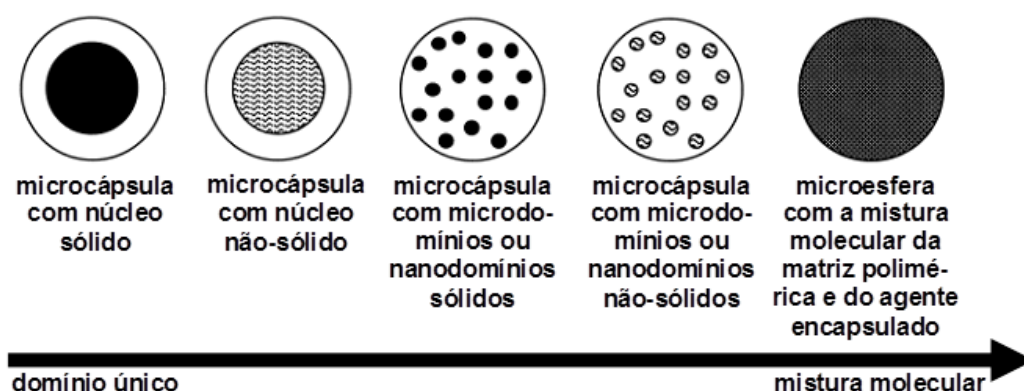
A microencapsulação pode permitir a proteção de fármacos sensíveis às condições ambientais, a eliminação de incompatibilidades entre dois ou mais ativos e o mascaramento do sabor desagradável dessas substâncias. As micropartículas são particularmente interessantes no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo prolongada. Esses materiais podem ampliar a biodisponibilidade de fármacos presentes em medicamentos de liberação imediata e minimizar possíveis efeitos colaterais (AHMAD et al., 2011; THOMPSON et al., 2007).

O termo micropartícula é resultante do tamanho dessas partículas que, geralmente, revelam um diâmetro médio entre 1 e 100 μm . Para a obtenção de

micropartículas, é possível utilizar diversos polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, que são capazes de liberar o fármaco por mecanismos de difusão e/ou de degradação (erosão) do material polimérico (GARAY; POCHEVILLE; MADARIAGA, 2010; KISSEL et al., 2006). Normalmente, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos de estruturas, as microesferas e as microcápsulas (Figura 1).

As microesferas são caracterizadas como sistemas matriciais, nos quais o fármaco está homogeneamente disperso no material polimérico. As microcápsulas, no entanto, constituem sistemas reservatórios, nos quais é possível identificar microdomínios diferenciados do fármaco, que pode ser sólido ou líquido (SUAVE et al., 2006; KUMAR, 2000).

FIGURA 1 – MODELOS DE ESTRUTURAS DAS MICROPARTÍCULAS



FONTE: Adaptado de BIRNBAUM & BRANNON-PEPPAS (2003).

O processo de microencapsulação, para ser considerado ideal, deve apresentar como características: rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo, facilidade em transpor para a escala industrial, além de ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e do material encapsulante em questão (GHARSALLAOUI et al., 2007; GIUNCHEDI & CONTE, 1995).

Vários métodos têm sido descritos na literatura para a obtenção de micropartículas, permitindo uma adequação às características físico-químicas dos diferentes fármacos. A escolha do procedimento mais efetivo na encapsulação de um determinado fármaco depende, basicamente, da hidrofilia/lipofilia do composto químico em avaliação (OBEIDAT, 2009).

Um sistema polimérico para a liberação de fármacos por via oral pode ser planejado e desenvolvido a partir de várias estratégias de processamento. Para a elaboração de microesferas, o método de emulsão e evaporação do solvente tem sido frequentemente empregado, face à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Nesse caso, o fármaco é dissolvido ou disperso em uma solução orgânica volátil contendo o polímero. Essa fase orgânica é emulsionada em uma fase aquosa, contendo um estabilizante da dispersão. O solvente é removido da fase interna pelo uso de calor, ou ainda, pela evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela aplicação de pressão reduzida. As microesferas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente adequado e secas sob condições apropriadas ou liofilizadas (TRAN; BENOÎTA; VENIER-JULIENNEA, 2011; OBEIDAT, 2009; JAIN, 2000).

Apesar da simplicidade das etapas, a formação de microesferas pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se a agitação e a natureza do estabilizante e dos solventes empregados na preparação. A capacidade de solvatação do polímero e, bem como, de dissolução do fármaco são características desejáveis ao solvente da fase interna. Além desses aspectos, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixo ponto de ebulição. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulação, o fármaco e o polímero também devem ter baixa solubilidade na fase externa (HESLINGA; MASTRIA; ENIOLA-ADEFESO, 2009; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; WATTS; DAVIES; MELIA, 1990).

A eficiência de encapsulação é estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração de fármaco inicialmente adicionada na formulação e a concentração presente nas partículas. Dessa maneira, quando o método de emulsão/evaporação do solvente é utilizado, a eficiência de encapsulação é fortemente influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco entre a fase interna e externa da emulsão. Fármacos caracterizados por apresentarem baixa hidrofilia podem ser encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão fase orgânica em fase aquosa (O/A). Entretanto, quando fármacos com elevada hidrofilia são empregados, baixas taxas de encapsulação têm sido observadas. Nesse caso,

a encapsulação pode ser realizada por meio da formação de uma emulsão inversa (A/O), na qual um solvente polar contendo o fármaco e o polímero são emulsionados em uma fase oleosa, como o óleo mineral (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; SHUKLA & PRICE, 1989). Para fármacos hidrofílicos, é possível, ainda, a obtenção de uma emulsão múltipla (A/O/A), em que a fase aquosa contendo o fármaco é dispersa em uma solução do polímero no solvente volátil, e essa emulsão resultante (A/O) é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (OBEIDAT, 2009; WATTS; DAVIES; MELIA, 1990; OGAWA et al., 1988). O método de secagem por aspersão ou *spray drying* tem sido também amplamente aplicado na formulação de sistemas microparticulados, pois possibilita a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos, como de ativos lipofílicos em emulsão aquosa (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Diferentes materiais poliméricos, com pequena ou nenhuma toxicidade, podem ser empregados na obtenção de micropartículas, nas quais a substância farmacologicamente ativa está dispersa ou dissolvida (OLIVEIRA & LIMA, 2006). Nesse contexto, o poli(metacrilato de metila), o poli(álcool vinílico), a poli(acrilamida), o polietilenoglicol, o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), os copolímeros do ácido láctico e do ácido glicólico (PLGA) e a policaprolactona (PCL) têm sido os biomateriais considerados clássicos e mais comuns à formação de micropartículas contendo fármacos, peptídeos, proteínas e antígenos (CHAKRAPANI, 2006).

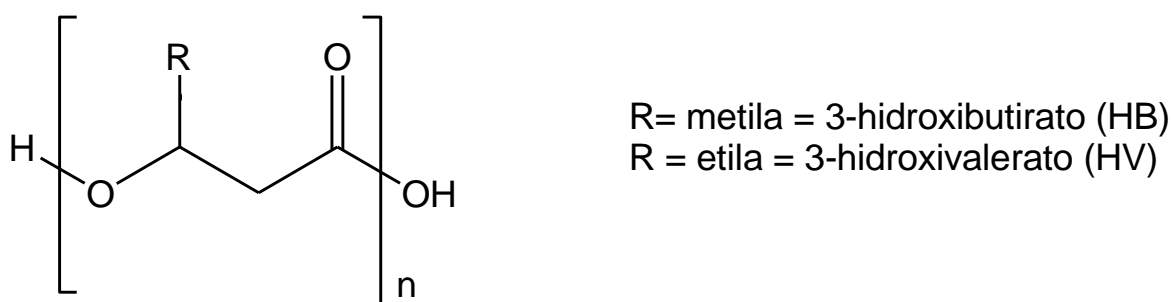
Outros materiais como proteínas (LU; ZHANG; YANG, 2003), polissacarídeos, (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2003), lipídeos (REITHMEIER; HERRMANN; GÖPFERICH, 2001) e a quitosana (SUAVE et al., 2006) têm sido estudados na liberação controlada, embora com uma frequência menor.

3.1.1 Poli(hidroxibutirato) e Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

Os poli-hidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres provenientes de fontes renováveis, derivados de hidroxiácidos, não sendo produzidos por síntese química, mas biossinteticamente por bactérias, a partir de matérias-primas naturais, como a cana-de-açúcar. Esses polímeros ficam reservados em vacúolos no interior das bactérias para fornecimento de energia (ROA et al., 2010).

Os polímeros mais comuns do grupo dos PHAs, que têm sido utilizados como sistemas de liberação modificada de fármacos, são o poli(hidroxibutirato) (PHB) e o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) (Figura 2) (CHEN, 2009).

FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO PHB E DO PHBV



FONTE: O autor (2016).

Além disso, o PHB apresenta inúmeras aplicações potenciais, como o uso em membranas biocompatíveis e em compósitos com hidroxiapatita (ROA et al., 2010). As estruturas químicas do PHB e do PHBV são muito similares aos polímeros sintéticos biodegradáveis mais usuais (PLA e PLGA), porém são degradados em uma taxa, geralmente, mais lenta (AMASS; AMASS; TIGHE, 1998).

Devido à biocompatibilidade e às propriedades não-tóxicas, o PHBV tem sido utilizado na preparação de micropartículas como sistemas de liberação modificada de fármacos (CHEN, 2009; FARAGO et al., 2008; ROSSI; AZGHANI; OMRI, 2004). A degradação das micropartículas de PHBV depende de alguns fatores como a massa molar do polímero e o grau de cristalinidade do mesmo. Nesse aspecto, quanto maior a presença de regiões amorfas no polímero, maior a sua capacidade de degradação (CHEN & DAVIS, 2002).

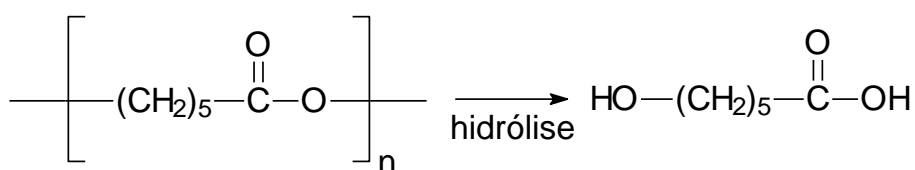
3.1.2 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, pertencente à classe dos poliésteres alifáticos, de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos. A PCL é um material semicristalino, que forma soluções coloidais em uma grande variedade de solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono,

benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Entretanto, tem uma baixa solubilidade em acetona, acetato de etila, 2-butanona, dimetilformamida e acetonitrila e é pouco solúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico. A fusão ocorre entre 59 e 64 °C e sua transição vítrea (T_g), geralmente, está entre – 70 e – 60 °C. Sua biocompatibilidade permite diversas aplicações no campo biomédico e na indústria farmacêutica (ROA et al., 2010; SINHA et al., 2004).

A PCL é capaz de sofrer degradação por meio de hidrólise das ligações éster da cadeia polimérica, gerando como produto final do processo o ácido ε -hidroxicaproico (Figura 3). Entretanto, a degradação da PCL é muito lenta devido a sua elevada hidrofobicidade, o que dificulta a penetração de água nas cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a ocorrência dessa reação (NAIR & LAURENCIN, 2007; SINHA et al., 2004).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DA PCL



FONTE: MERKLI et al., 1998.

A lenta degradação da PCL em sistemas poliméricos de liberação modificada de fármacos não gera um microambiente ácido, como o produzido pelos polímeros PLA e PLGA. Esse fato é uma vantagem da PCL no desenvolvimento de micropartículas contendo proteínas, uma vez que essas macromoléculas podem desnaturar em função do pH e perder a sua atividade biológica. Outras vantagens relacionadas à PCL, frente aos polímeros PLA e PLGA, são o menor custo e a possibilidade de liberação de fármacos por um período mais prolongado (AL HAUSHEY et al., 2007).

3.1.3 Polímero Metacrílico Eudragit® L 100

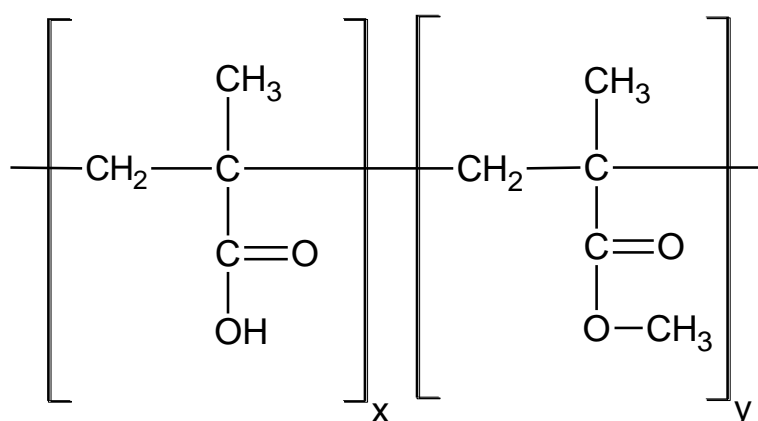
A utilização de matrizes poliméricas acrílicas, também conhecidas como polímeros entéricos, tem atraído atenção, no que diz respeito ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada por via oral. Estes polímeros são essencialmente

pouco solúveis no suco gástrico, cujo pH é bastante baixo, e podem ser utilizados para conferir liberação entérica para fármacos encapsulados (de OLIVEIRA et al., 2009; LOPES, 2000).

Particularmente, os copolímeros de ácidos, tais como os polímeros Eudragit[®], são amplamente utilizados no desenvolvimento de substâncias farmacêuticas encapsuladas. Os copolímeros são derivados de ésteres do ácido acrílico e metacrílico, cujas propriedades físico-químicas são determinadas pela modificação do grupo funcional (R) da molécula. Estes polímeros permitem que o fármaco, na sua dose usual, seja liberado da matriz do copolímero em um determinado ponto do trato gastrointestinal, se dissolva e seja absorvido de forma apropriada (ZHANG et al., 2011).

O Eudragit[®] L100 (Figura 4) é um copolímero entérico, cuja solubilidade é dependente do pH e que possui grupos de ácido metacrílico (metacrilatos) na sua estrutura, sendo utilizado para administração oral e liberação controlada, uma vez que é pouco solúvel em soluções ácidas ($\text{pH} < 3$) e solúvel em soluções neutras ou alcalinas ($6 < \text{pH} < 8$). Este copolímero pode controlar a liberação do fármaco contido nele à medida que passa através do trato gastrointestinal, de acordo com a variação do pH, liberando lentamente o componente bioativo em pH de 6 a 7 e impedindo a sua liberação em pH próximo a 2 (de OLIVEIRA et al., 2009).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO EUDRAGIT[®] L100



FONTE: O autor (2016).

3.2 DISPERSÕES SÓLIDAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

O aumento da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis representa um dos problemas mais desafiadores da ciência farmacêutica (LIN & HUANG, 2010). Nesse sentido, a utilização de recursos capazes de promover uma maior solubilização do fármaco é uma alternativa bastante viável, sendo que várias tecnologias industriais farmacêuticas têm sido extensivamente estudadas para esse fim (DHILLON et al., 2014; SAKURAI et al., 2012; TRAN et al., 2010; YU et al., 2010; KARAVAS et al., 2007).

As pesquisas de fármacos com baixa solubilidade aquosa aumentaram significativamente na indústria farmacêutica. Na maioria das vezes, esses fármacos possuem uma estrutura cristalina estável, dificultando sua biodisponibilidade por via oral, a qual pode ser otimizada por meio de sistemas de dispersões sólidas (PATEL et al., 2014; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; GHOSH et al., 2011; HUGHEY et al., 2011; AL-HAMIDI et al., 2010).

As dispersões sólidas podem ser definidas como misturas entre fármacos com baixa solubilidade aquosa e transportadores hidrofílicos, nas quais as propriedades do excipiente passam a influenciar o perfil de liberação da substância terapeuticamente ativa. Esse sistema permite dispersar o fármaco de forma homogênea na matriz, além de assegurar o umedecimento por completo da mistura e melhorar a dissolução e a estabilidade do ativo (HUANG & DAI, 2014; AL-OBAIDI et al., 2011; YU et al., 2010; DAHLBERG; FUREBY; SCHULEIT, 2008). A matriz hidrofílica pode ser cristalina ou não-cristalina (amorfa), na qual o fármaco pode estar molecularmente disperso ou formando domínios cristalinos (CHEN et al., 2015; VIPPAGUNTA et al., 2006).

Em 1961, Sekiguchi e Obi conseguiram aumentar a velocidade de dissolução de um fármaco pouco solúvel por meio da formulação de uma mistura eutética. Essas preparações foram elaboradas utilizando matrizes cristalinas, como a uréia e alguns açúcares, e foram designadas como dispersões sólidas de primeira geração. Elas apresentavam como principal desvantagem a formação de dispersões sólidas cristalinas termodinamicamente mais estáveis, portanto, não liberavam o fármaco tão rapidamente como os sistemas amorfos (BLEY; FUSSNEGGER; BODMEIER, 2010; SANTOS, 2008).

No final da década de 1960, surgiram as dispersões sólidas formadas por matrizes amorfas que foram chamadas de dispersões sólidas de segunda geração. Nesse caso, a interação entre o fármaco e a matriz pode ser classificada em soluções sólidas, suspensões sólidas, ou uma mistura de ambas. Essa geração está dividida em polímeros totalmente sintéticos, como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG) e polímeros metacrílicos, e polímeros sintéticos baseados em produtos naturais, como os derivados da celulose, por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxietilpropilcelulose ou derivados do amido. As ciclodextrinas, oligômeros cíclicos da glucose também permitem a obtenção de dispersões sólidas de segunda geração (ALMEIDA, 2009). Dentre estes polímeros hidrofílicos, o PVP e o PEG destacam-se devido a sua solubilidade em água, por serem de baixo custo e pela capacidade de formar uma solução sólida no estado amorfo (PATEL, 2014; VAN DEN MOOTER; AUGUSTIJNS; BLATON, 1998).

A terceira geração de dispersões sólidas contém uma matriz tensoativa, ou uma mistura entre polímeros amorfos e tensoativos como carreadores. Nesse sentido, as formulações permitem obter a máxima biodisponibilidade para o fármaco de baixa solubilidade aquosa, além de conferir estabilidade a dispersão sólida, por impedir a recristalização do fármaco. A utilização de polímeros tensoativos como a inulina, os copolímeros em bloco do óxido de etileno e do óxido de propileno (poloxâmero, Pluronic-F68), o (di) berrenato de glicerila (Compritol 888 ATO), glicerídeos de polietilenoglicol-32 lauroila (Gelucire 44/14) tem sido amplamente difundida (YU et al., 2010; LI et al., 2006). Com relação ao preparo de dispersões sólidas, os poloxâmeros apresentam excelentes propriedades como carreadores de fármacos, pois possuem a capacidade de alterar as propriedades físicas do sistema polimérico, tais como hidrofobicidade, carga superficial, floculação/dispersão, flutuação e molhabilidade (PATEL, 2014; SENTHILKUMAR & SIRISHA, 2011; VYAS; SANCHETI; KAREKAR, 2009; CHEN; ZHANG; NEILLY, 2004).

Dessa forma, as dispersões sólidas têm sido demonstradas como um método viável e econômico (SAKURAI et al., 2012) para melhorar a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade aquosa por meio do aumento de sua taxa de dissolução (HUANG & DAI, 2014; MAULVI et al., 2011; YU et al., 2010).

As dispersões sólidas podem ser obtidas por meio de vários métodos (trituração, malaxagem, coevaporação, fusão, liofilização e *spray-drying*), sendo que a escolha do método poderá ser devido ao fármaco e às características da forma

farmacêutica final (RIEKES; FERNANDES; STULZER, 2010). O método de trituração é o mais clássico de todos e consiste na mistura física do fármaco e do excipiente, por meio da aplicação de uma força de cisalhamento, com o uso de gral e pistilo ou de moinhos, sem a presença de um líquido de umedecimento. Embora ele permita a obtenção de dispersões sólidas com simplicidade, em comparação aos outros métodos, tem demonstrado ser menos efetivo no aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis. A malaxagem consiste no preparo de uma massa umidificada, a partir da adição da mínima quantidade de líquido suficiente para umedecer a mistura em pó de fármaco e excipiente. Durante a malaxagem, deve-se assegurar o mínimo de perda de umidade da massa por evaporação, para isso, o tempo e a velocidade da malaxagem devem ser controlados. Em escala laboratorial, é realizada em gral, com o auxílio de pistilo. A secagem do material pode ser feita em estufa em temperatura controlada. Devido à simplicidade, esse método é um dos mais utilizados na indústria farmacêutica (SANTOS, 2008; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; SANTOS et al., 2004).

No caso da coevaporação, este método consiste na evaporação dos solventes nos quais o fármaco e o polímero foram previamente dissolvidos. A principal vantagem desse método é o fato da evaporação ocorrer em temperaturas baixas, o que é ideal para fármacos sensíveis e instáveis a temperaturas elevadas. A remoção completa do solvente utilizado é, muitas vezes, um processo difícil e lento, sendo então, um ponto crítico para a qualidade das dispersões sólidas elaboradas, por existir a possibilidade de efeitos adversos (ALMEIDA, 2009).

Outra possibilidade de preparação de dispersões sólidas consiste no método da fusão em que o fármaco é disperso em uma matriz ou polímero, previamente fundido(a). Por meio de agitação mecânica, mantendo o aquecimento, forma-se uma mistura uniforme. Retirando o aquecimento, após arrefecimento, a mistura solidifica, sendo posteriormente pulverizada e tamisada, originando um granulado. Esse método apresenta como vantagem o fato de ser bastante econômico, sem recorrer a equipamentos sofisticados e solventes orgânicos. Mas, tem a desvantagem de que muitos fármacos ou carreadores podem sofrer decomposição durante o processo de fusão a elevadas temperaturas, além de poder ocorrer transformações polimórficas. A escolha da temperatura de fusão do sistema deve ser feita bastante abaixo do ponto de fusão dos dois componentes quando puros, evitando assim, a decomposição dessas substâncias (ANDRADE, 2009).

A liofilização pressupõe uma dissolução do fármaco e do carreador em solventes adequados, um congelamento e uma sublimação dessa mistura, como forma de obter uma dispersão molecular liofilizada. Essa técnica permite a obtenção de sistemas com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente, são obtidos pós, secos, amorfo e com elevado grau de interação fármaco-excipiente. Apresenta como desvantagens, o longo tempo de processamento e as más características de fluxo do material obtido (ALMEIDA, 2009).

O uso da tecnologia *spray-drying* ou secagem por aspersão na preparação de dispersões sólidas também tem sido uma realidade frequente nas indústrias farmacêuticas. A técnica proporciona uma rápida secagem e um tamanho e forma específicos das partículas do produto final. Esse método consiste em três etapas fundamentais. Na primeira, o fluido é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida, que geralmente apresenta o mesmo tamanho e forma da gotícula que a originou. Nesta última etapa, o produto da secagem é transportado por uma corrente de ar sendo posteriormente coletado. O processo de *spray-drying* apresenta diversas vantagens, tais como, o controle da uniformidade e do tamanho da partícula, a rapidez e o rendimento e os custos do processo são baixos (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010; PARADKAR et al., 2004). As dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão consistem em partículas cujo tamanho pode ser delineado a partir da modificação no tamanho da gotícula, com o intuito de satisfazer os requisitos necessários para o processo ou aplicação (por exemplo, partículas de fluxo livre ou partículas para a inalação). A secagem por aspersão produz geralmente fármacos no estado amorfo (PARADKAR et al., 2004), no entanto, pode ocorrer, a cristalização do fármaco (parcialmente) durante o processo de secagem (WEUTS et al., 2005).

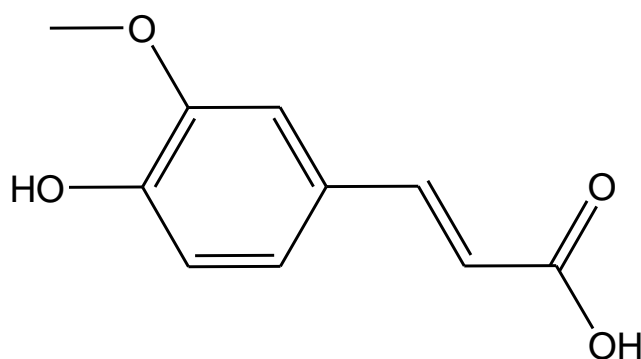
Independente do método a ser utilizado, em geral, nas dispersões sólidas, uma combinação de fatores atua para aprimorar a dissolução do fármaco, incluindo a redução do tamanho da partícula, com consequente aumento da área de superfície, a aglomeração reduzida, a molhabilidade e a solubilidade elevadas e o maior grau de porosidade. A porosidade depende do tipo de carreador e da dispersão do fármaco que podem estar como microcristais finos, como material amorfo ou em forma molecular. Além disso, a liberação do fármaco pode ser

otimizada usando o fármaco no estado amorfo, pois nenhuma energia é necessária para romper a estrutura cristalina durante o processo de dissolução (HUANG & DAI, 2014; WU et al., 2011; ALI; WILLIAMS; RAWLINSON, 2010).

3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO ÁCIDO FERÚLICO

O ácido ferúlico ou ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico (Figura 5) é um composto químico extremamente abundante no reino vegetal, que tem baixa toxicidade e é sintetizado a partir da via do chiquimato, a partir da fenilalanina ou da L-tirosina. Na natureza ocorre principalmente como isômero *E* (WANG et al., 2011; ITAGAKI et al., 2009). Considerando suas propriedades físico-químicas e biológicas, o ácido ferúlico apresenta solubilidade aquosa de 6,63 mg.dL⁻¹ em pH 7,2 (SAIJA, 2000), uma meia-vida de 42 min (ZHAO, 2008) e um coeficiente de partição octanol/água (log P) de 1,67 (ROLEIRA, 2010).

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FERÚLICO



FONTE: O autor (2016).

Estudos anteriores demonstraram que o ácido ferúlico tem atividade terapêutica diversificada, incluindo efeitos como anti-inflamatório, antioxidante, antitrombótico, anticancerígeno, neuroprotetor e cardioprotetor. Quando aplicado sobre a pele pode apresentar um efeito fotoprotetor (MERLIN et al., 2012; STANIFORTH et al., 2012; DU; CAO; YU, 2011; WANG et al., 2011; YU et al., 2010; SCALIA et al., 2009).

As propriedades do ácido ferúlico estão relacionadas à inibição das enzimas citotóxicas associadas à inflamação, incluindo a óxido nítrico sintetase induzida e

ciclo-oxigenase-2, contribuindo assim, para seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (STANIFORTH et al., 2012; ANSELM I et al., 2008; ANSELM I et al., 2006).

A capacidade antioxidante do AF é possivelmente devida a três características estruturais diferentes. Em particular, a presença do hidrogênio lábil pertencente ao grupo fenólico, formando um sistema totalmente conjugado, que envolve o anel aromático, a ligação dupla e a carbonila do ácido carboxílico, confere propriedades relevantes em termos de efeito antioxidante, por conduzir a formação de produtos estáveis de menor energia. A presença da insaturação na cadeia lateral proporciona sítios para o ataque por radicais livres (ITAGAKI et al., 2009). Além disso, o grupo ácido carboxílico pode permitir uma interação com a bicamada lipídica da membrana celular que fornece proteção contra a peroxidação lipídica (VASHISTH et al., 2015; ITAGAKI et al., 2009; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

Apesar dessas atividades biológicas, a utilidade terapêutica do ácido ferúlico é limitada devido às suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, notadamente a baixa solubilidade aquosa (SAIJA et al., 2000), uma vez que o fármaco apresenta natureza hidrofóbica e é um composto oxidável e fotossensível, resultando em sua conversão parcial do isômero *E* para o isômero *Z* (ANSELM I et al., 2008). Nesse sentido, sua biodisponibilidade pode ser reduzida, levando a um efeito mínimo *in vivo* por administração oral (WANG et al., 2011).

Assim, considerando as propriedades físico-químicas desfavoráveis do fármaco, torna-se desejável estabilizar o ácido ferúlico, aumentando sua biodisponibilidade, por meio do uso de sistemas poliméricos. No entanto, poucos estudos sobre sistemas de liberação imediata e/ou modificada contendo ácido ferúlico estão disponíveis na literatura. Dessa forma, o presente trabalho, tem como proposta o desenvolvimento de três diferentes sistemas poliméricos inovadores contendo ácido ferúlico, visando avaliar a habilidade desses materiais na encapsulação/incorporação, no controle da liberação e na estabilidade do fármaco, para assegurar uma maior adequação ao uso clínico como antioxidante, citoprotetor e antiagregante plaquetário.

3.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA OU MODIFICADA CONTENDO O ÁCIDO FERÚLICO

Diferentes sistemas farmacêuticos têm sido investigados com o propósito de avaliar o aumento da solubilidade e/ou da liberação do ácido ferúlico.

Anselmi et al. (2006) trabalharam com a formação de complexos de inclusão *in vitro* de γ -ciclodextrina-ácido ferúlico, com o objetivo de melhorar a estabilidade físico-química do antioxidante, em função da sua utilização como filtro solar. Os resultados demonstraram evidências de que o ácido ferúlico pode ser eficientemente complexado com a γ -ciclodextrina, sendo uma poderosa ferramenta farmacêutica/cosmética para exercer a atividade biológica proposta.

Anselmi et al. (2008) incorporaram o ácido ferúlico em α -ciclodextrinas, estruturas moleculares que têm uma cavidade menor que a γ -ciclodextrina utilizada no estudo anterior, com o propósito de melhorar a estabilidade físico-química do complexo de inclusão, visto que a sua relação tamanho/formato e as interações de hidrogênio são vitais para a estabilidade do complexo de inclusão. Foi possível observar que a inclusão do hóspede no interior da α -ciclodextrina envolve basicamente o grupo carboxila, os carbonos α - e β -insaturados e parte da porção aromática. A encapsulação aumentou a fotoestabilidade do ácido ferúlico, resultado que extrapolado para uma situação *in vivo*, sugere que a aplicação tópica de uma formulação cosmética contendo esse filtro solar, pode assegurar uma proteção mais segura e mais duradoura.

Yu et al. (2010) desenvolveram dispersões sólidas de terceira geração em nanofibras, utilizando o ácido ferúlico como fármaco modelo. A dissolução *in vitro* e os testes de permeação mostraram que as dispersões sólidas em nanofibras podem liberar rapidamente o ácido ferúlico, com aumento da taxa de permeação através da mucosa sublingual, quando comparadas ao ácido ferúlico sem tratamento.

Wang et al. (2011) preparam complexos de inclusão hidroxipropil- β ciclodextrinas-ácido ferúlico pelo método de liofilização. Os resultados demonstraram que o complexo de inclusão tem características físico-químicas diferenciadas do ácido ferúlico puro, sendo que a solubilidade aquosa e a estabilidade do ácido ferúlico aumentaram significativamente.

Cheng, Yang, Lin (2011) estudaram a viabilidade de uso de um hidrogel termossensível obtido com quitosana, gelatina e fosfato de glicerila, como um sistema de liberação modificada de ácido ferúlico para regeneração do núcleo pulposo. Nessa investigação relataram que o ácido ferúlico incorporado no hidrogel pode diminuir significativamente o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 .

Merlin et al. (2012) elaboraram nanopartículas de PLGA contendo ácido ferúlico e estudaram a sua liberação em linhagens celulares de câncer de pulmão humano (NCI-H460). As nanopartículas de PLGA contendo ácido ferúlico apresentaram 76% de encapsulação e efeito anticâncer, com diminuição da proliferação celular e mecanismo de ação baseado em danos ao DNA e em promover apoptose nas células NCI-H460.

Ouimet et al. (2013) incorporaram o ácido ferúlico, por meio de uma reação de polimerização, a um poli(anidrido-éster), polímero biodegradável, a fim de minimizar a decomposição e aumentar a estabilidade físico-química desse antioxidante. O complexo resultou numa atividade antioxidante e antibacteriana comparável a do ácido ferúlico puro e não apresentou citotoxicidade quando avaliado em culturas de fibroblastos sendo, portanto, uma estratégia interessante no desenvolvimento de formulações de aplicação tópica.

Wu et al. (2014) desenvolveram nanopartículas de ácido ferúlico conjugado ao glicol de quitosana com o intuito de prolongar e vetorizar a liberação do fármaco para o tratamento de lesões da medula espinhal.

Dessa forma, considerando o pequeno número de artigos que tratam sobre sistema de liberação imediata ou modificada contendo ácido ferúlico, associado principalmente, à possibilidade de melhorar os efeitos biológicos do fármaco, surge a perspectiva de obter, caracterizar e avaliar *in vitro* e *in vivo* micropartículas poliméricas e dispersões sólidas como sistemas poliméricos contendo o ácido ferúlico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador mecânico (QUIMIS, modelo 235, Diadema, Brasil);
- Analisador de umidade por infravermelho (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão);
- Balança analítica de prato único (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Banho-maria (LOGEN SCIENTIFIC, São Paulo, Brasil);
- Cabine de fluxo unidirecional (Laminar) (VECOFLOW, Campinas, Brasil);
- Centrífuga para tubos (BIO ENG, modelo BE-4004, São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência dotado de detector de ultravioleta (Varian Pro-star SYS-LC-240-E, Palo Alto, CA, Estados Unidos);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raio-X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quioto, Japão);
- Dissolutor de cubas (NOVA ÉTICA, modelo 299-6ATTS, Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos);
- Espectrômetro de difração a laser (CILAS, modelo Cilas 920 L, Marseille, França);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q-136M4, Diadema, Brasil);
- Incubadora de CO₂ (SANYO, modelo MC0-19AIC (UV), Osaka, Japão);
- Leitor de microplacas (BIO-TEK INSTRUMENTS, modelo Synergy H1, Winooski, VT, Estados Unidos);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópico eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550 Superscan, Quioto, Japão);
- Microscópio invertido (QUIMIS, modelo Q7-301, Diadema, Brasil);

- Placa de agitação e aquecimento (QUIMIS, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (SHIMADZU, modelo DSC-60, Quioto, Japão);
- Spray Dryer (LABMAQ, modelo MSD 0.5, Ribeirão Preto, Brasil).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Ácido ferúlico (99,80% de pureza, Suzhou Leader Chemical, Suzhou, China)

4.2.2 Polímeros

- Álcool polivinílico (PVA) (\overline{M}_w 72.000 g.mol⁻¹, 88,5 mol% de hidrólise, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Poli- ϵ -caprolactona (PCL) (\overline{M}_w 70.000 a 90.000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) (\overline{M}_w = 380.000 g.mol⁻¹ 8,70 mol% de hidroxivalerato, Biocycle[®] L 110, PHB Industrial, Serrana, Brasil);
- Poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit[®] L100) (\overline{M}_w = 125.000 g.mol⁻¹, Röhm Pharma Polymers, Darmstadt, Alemanha);
- Polivinilpirrolidona K30 (PVP-K30) (\overline{M}_w = 58.000 g.mol⁻¹, Jiaozuo Meida Fine Chemical, Shanghai, China);
- Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) (\overline{M}_w = 5.000-7.000 g.mol⁻¹, Fluka, St. Louis, MO, EUA);
- Poloxâmoro-188 (PLX-188) (polímero em bloco do poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), \overline{M}_w = 8.400 g.mol⁻¹, Basf, Ludwigshafen, Alemanha).

O fármaco e os polímeros foram empregados sem qualquer tratamento prévio.

4.2.3 Água Purificada

Para o desenvolvimento dos sistemas poliméricos foi utilizada água ultrapura pelo processo Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA).

4.2.4 Reagentes e Meios Usados no Cultivo Celular

- Ácido fosfórico P.A. (H_3PO_4) (Vetec, Brasil);
- α -Naftiletenodiamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Azul de Tripán (Sigma Chemical, Estados Unidos);
- Bicarbonato de sódio P.A. (Vetec, Brasil);
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT) (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Formaldeído (Merck Biosciences, Darmstadt, Alemanha);
- Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* 055:b5 (LPS) (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Meio RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil);
- Penicilina/Estreptomicina (Vitrocell, Brasil);
- Peróxido de hidrogênio P.A. (Vetec, Brasil);
- Soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil);
- Sulfanilamida (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Sulfóxido de dimetila (DMSO) P.A. (Vetec, Brasil);
- Tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, EUA)

4.2.5 Outros Reagentes e Solventes

- Ácido *ortho*-fosfórico (85,0% de pureza, Synth, Diadema, Brasil);
- Álcool etílico P.A. (EtOH) (99,8% de pureza, Synth, Diadema, Brasil);
- Álcool metílico P.A. (CH_3OH) (99,8% de pureza, Synth, Diadema, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

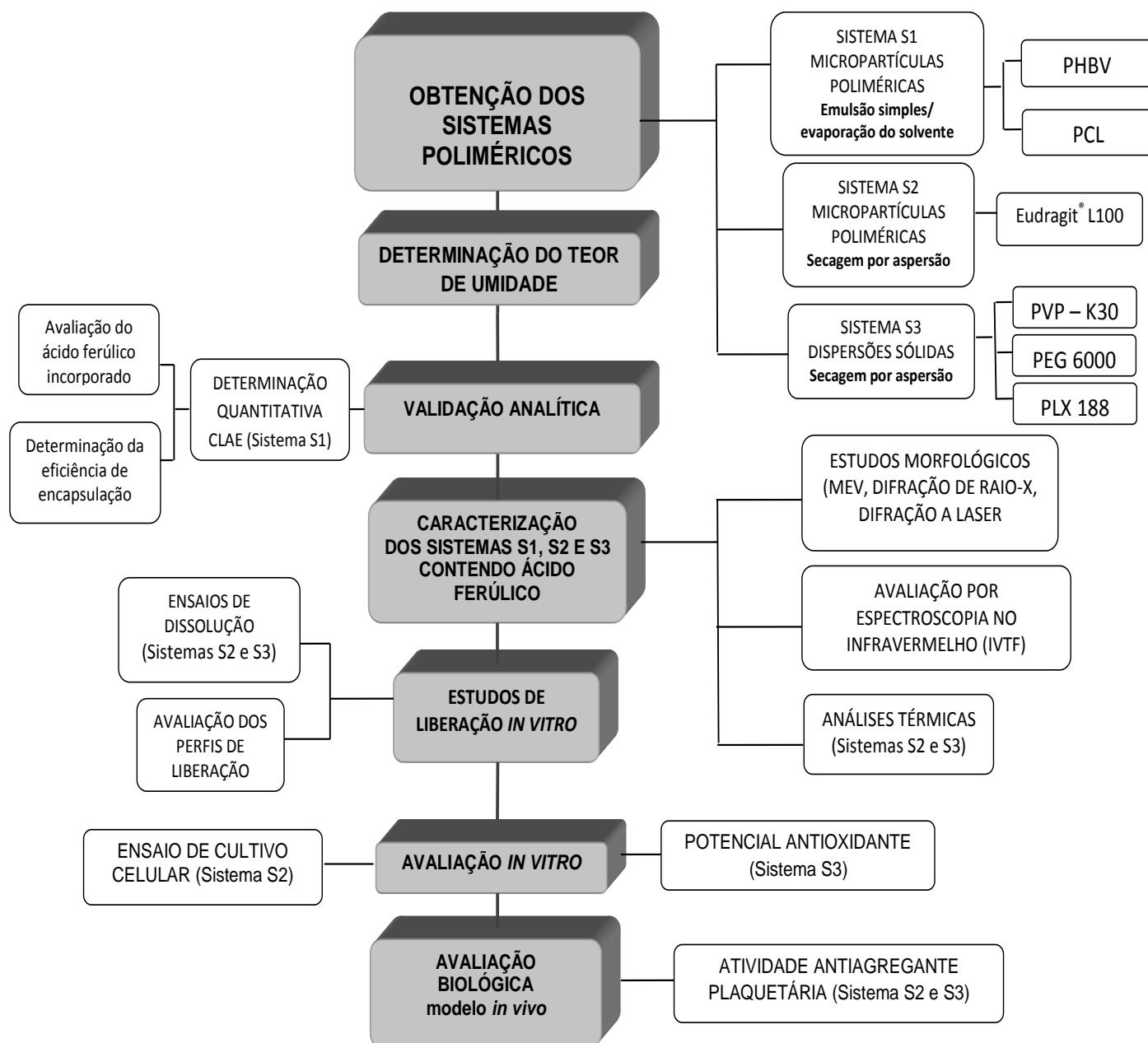
- Clorofórmio P.A. (HCCl_3) (Synth, Diadema, Brasil);
- Diclorometano (CH_2Cl_2) (Hexis Científica, Indaiatuba, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. (KH_2PO_4) (Synth, Diadema, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Synth, Diadema, Brasil);
- Metanol grau HPLC (EMD Chemicals, Darmstadt, Alemanha);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween[®] 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil).

Os solventes orgânicos apresentaram grau analítico e foram usados sem tratamento prévio.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa teve início com a obtenção de três diferentes sistemas poliméricos contendo o ácido ferúlico. Para a determinação quantitativa do ácido ferúlico incorporado nos sistemas poliméricos foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação/incorporação do fármaco. Os sistemas poliméricos foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. O mecanismo de liberação *in vitro* do ácido ferúlico foi estudado a partir do ensaio de dissolução e os perfis de liberação foram avaliados por métodos matemáticos modelo-independentes e modelo-dependentes. A estabilidade do ácido ferúlico frente à radiação ultravioleta e a possível formação de produtos de degradação foi investigada. O efeito antioxidante *in vitro* das dispersões sólidas foi investigado pelo método de descoloração do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico). As formulações de micropartículas metacrílicas contendo ácido ferúlico foram submetidas a estudos *in vitro* frente à linhagem celular J774A.1, para a determinação da citotoxicidade, citoproteção, produção de óxido nítrico e efeito na geração de espécies reativas de oxigênio. A avaliação biológica das formulações de micropartículas poliméricas e de dispersões sólidas foi conduzida empregando modelo *in vivo* de atividade antiagregante plaquetária. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 6.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: O autor (2016).

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção dos Sistemas Poliméricos

4.4.1.1 Sistema S1: micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico obtidas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente orgânico, a partir do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e poli- ϵ -caprolactona

As micropartículas foram obtidas a partir do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) ou da poli- ϵ -caprolactona (PCL). Os sistemas foram denominados M1 (micropartículas formuladas com o PHBV) e M2 (micropartículas preparadas com a PCL). Esses materiais foram obtidos em concentrações teóricas de 0, 5, 10 e 20% de ácido ferúlico na composição (AF0, AF5, AF10 e AF20, respectivamente).

As micropartículas que compõem os sistemas S1 (M1 e M2) foram elaboradas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico (LI et al., 2008), a partir das formulações indicadas na Tabela 1.

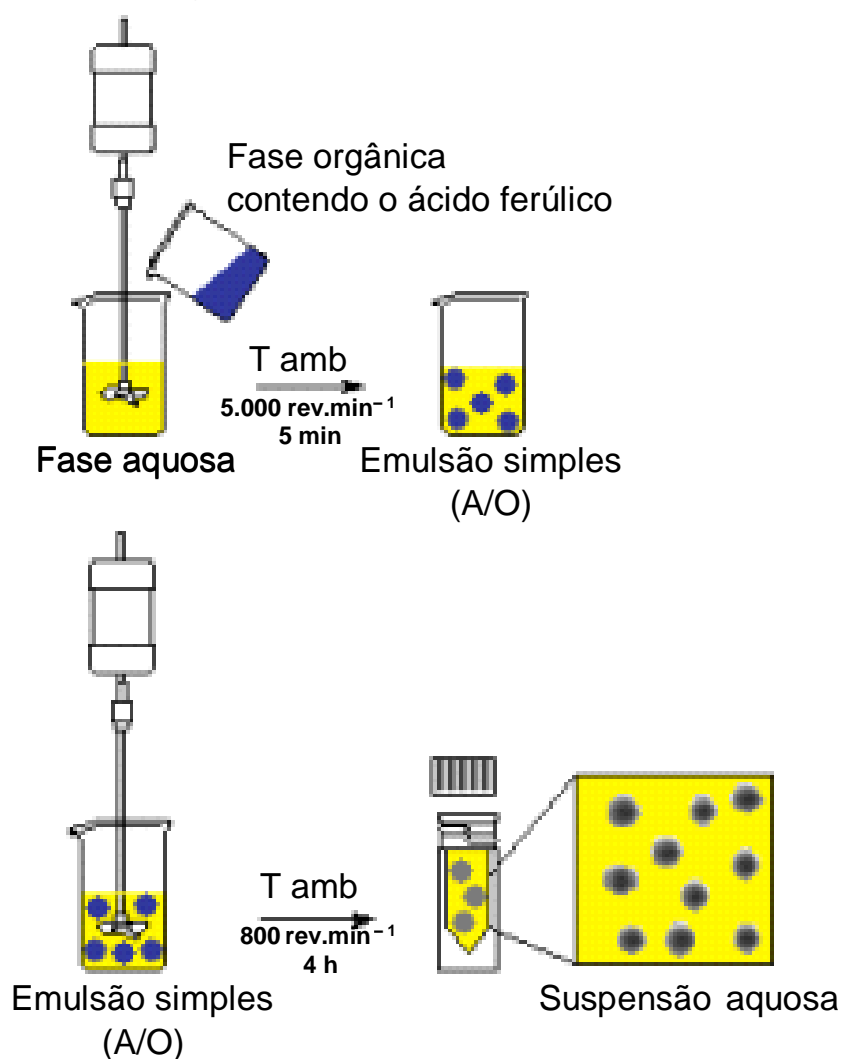
TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DO PHBV E DA PCL (SISTEMA S1M1 E S1M2)

Composição	Formulação			
	AF0	AF5	AF10	AF20
Fase aquosa				
Polisorbato 80 (g)	0,25	0,25	0,25	0,25
PVA (g)	4,00	4,00	4,00	4,00
Água ultrapura (mL) <i>q.s.p.</i>	200,0	200,0	200,0	200,0
Fase orgânica				
Ácido ferúlico (g)	—	0,10	0,20	0,40
PHBV (sistema M1) ou PCL (sistema M2) (g)	2,00	1,90	1,80	1,60
Clorofórmio (sistema M1) ou Diclorometano (sistema M2) (mL)	40,0	40,0	40,0	40,0

De forma sintética, o ácido ferúlico foi dissolvido no solvente orgânico apropriado (sistema S1M1: clorofórmio; sistema S1M2: diclorometano) contendo o polímero (PHBV ou PCL). A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa, sob

agitação mecânica ($5.000 \text{ rev.min}^{-1}$) por 5 min. A emulsão formada foi mantida em agitação mecânica (800 rev.min^{-1}), à temperatura ambiente, durante 4 h (Figura 7).

FIGURA 7 – ESQUEMA DE FORMAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DO SISTEMA S1 (M1 E M2) CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO PELO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO



FONTE: O autor (2016).

Transcorrido o tempo para a evaporação do solvente orgânico, as micropartículas foram separadas por centrifugação ($2.500 \text{ rev.min}^{-1}$, 10 min) e lavadas, por 2 vezes, com água purificada. Os produtos obtidos foram secos em estufa a $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As micropartículas foram armazenadas na temperatura ambiente.

Todas as formulações foram desenvolvidas em triplicata, sendo que as micropartículas denominadas M1AF0 e M2AF0 foram elaboradas na ausência do fármaco, como controle negativo.

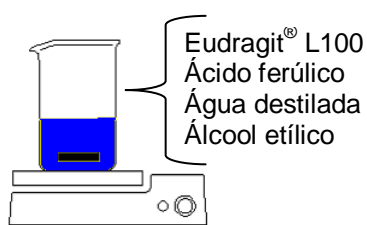
4.4.1.2 Sistema S2: micropartículas contendo ácido ferúlico preparadas pelo método de secagem por aspersão, a partir do polímero metacrílico Eudragit® L100

A obtenção das micropartículas contendo o ácido ferúlico que constituem o sistema S2 foi conduzida pelo método de secagem por aspersão ou *spray-drying* (Figura 8).

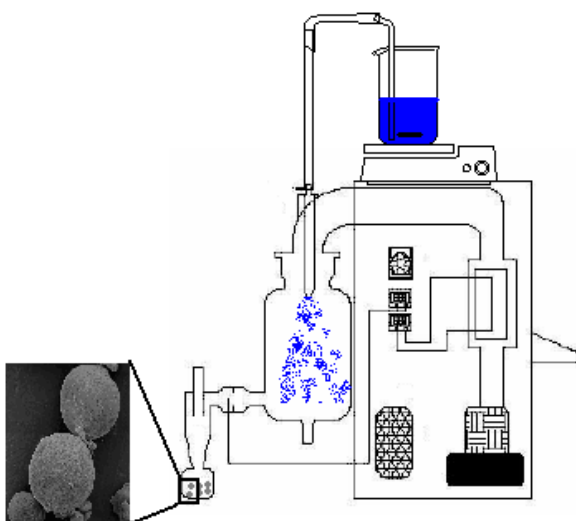
A partir do ácido ferúlico e do polímero poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit® L100) foram desenvolvidas as formulações de micropartículas que compõem o sistema S2, que foram denominadas M3, nas proporções (em massa) indicadas na Tabela 2.

FIGURA 8 – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DO SISTEMA S2 CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO

A) Preparação da fase aquosa



B) Secagem por aspersão e formação das micropartículas



FONTE: O autor (2016).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DO POLÍMERO METACRÍLICO EUDRAGIT® L100 (SISTEMA S2)

Composição	Formulação			
	AF0	AF5	AF10	AF20
Fase hidroalcoólica				
Ácido ferúlico (g)	—	0,20	0,40	0,80
Poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit® L100) (g)	4,00	3,80	3,60	3,20
Água ultrapura (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0
Álcool etílico (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0

Nesse método, o material polimérico foi dissolvido/disperso em 200 mL de álcool etílico por agitação magnética (800 rev.min⁻¹), na temperatura ambiente. Em seguida, sob agitação magnética, o ácido ferúlico foi adicionado. Após a dissolução do fármaco e do polímero, 200 mL de água destilada foi adicionada lentamente e a solução mantida em agitação por 12 h. Transcorrido esse período, a formulação foi conduzida à secagem por aspersão, utilizando o Spray Dryer LABMAQ, modelo MSD 0.5, operando nas seguintes condições: diâmetro do atomizador: 0,82 mm, pressão de atomização: 3 kgf.cm⁻², fluxo do ar de secagem: 50 L.min⁻¹, fluxo de alimentação da formulação em secagem: 0,20 L.h⁻¹, temperatura de entrada: 135 ± 5 °C e temperatura de saída: 60 ± 5 °C.

As micropartículas foram obtidas em triplicata. Além disso, micropartículas designadas de M3AF0 foram desenvolvidas, na ausência do fármaco, compondo, a formulação controle. Todos os produtos microparticulados que integram o sistema S2 foram armazenados na temperatura ambiente, em recipientes hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, no interior de dessecador à vácuo.

4.4.1.3 Sistema S3: dispersões sólidas contendo ácido ferúlico, formuladas pelo método de secagem por aspersão

As dispersões sólidas de ácido ferúlico foram preparadas pelo método de secagem por aspersão, a partir dos polímeros PVP-K30, PEG 6000 e PLX-188.

O sistema foi denominado S3 (dispersões sólidas preparadas por *spray drying*). Esses materiais foram obtidos em concentrações teóricas de 0, 10 e 20% de

ácido ferúlico na composição. Previamente, o fármaco e o polímero foram passados através de um tamis malha 60. Todas as formulações foram obtidas em triplicata.

O fármaco puro e o polímero foram dissolvidos em volume adequado de etanol e água destilada, respectivamente (Tabela 3). As soluções foram mantidas sob agitação magnética durante 24 h a temperatura ambiente sem exposição à luz. Após esse período, as soluções foram misturadas e a formulação obtida foi mantida por mais 24 h em agitação magnética. A solução foi então conduzida à secagem por aspersão, utilizando o Spray Dryer LABMAQ, modelo MSD 0.5, operando nas condições: temperatura de entrada de 135 ± 5 °C, temperatura de saída de 50 ± 5 °C, taxa de alimentação de $0,20 \text{ L.h}^{-1}$, fluxo do ar de secagem 50 L.min^{-1} .

Todas as preparações obtidas foram armazenadas a temperatura ambiente, em recipientes hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, no interior de dessecador a vácuo.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO PREPARADAS PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO (SISTEMA S3)

Composição	Formulação		
	0%	10%	20%
Fase aquosa			
Polímero (g)	4,00	3,60	3,20
H ₂ O ultrapura (mL)	100,0	100,0	100,0
Fase orgânica			
Ácido ferúlico (g)	—	0,40	0,80
Álcool etílico (mL)	100,0	100,0	100,0

4.4.1.4 Misturas físicas

Para uma caracterização mais completa e comparativa dos sistemas em estudo, foram preparadas diferentes misturas físicas, envolvendo os diferentes polímeros utilizados e o ácido ferúlico. Foram elaboradas misturas físicas na proporção, em massa, de 1:1 (ácido ferúlico:polímero) (50% m/m) para os sistemas S1, S2 e S3.

4.4.2 Rendimento

4.4.2.1 Sistema S1

O rendimento (R) das formulações do sistema S1 foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação das micropartículas pela soma das massas do PHBV ou da PCL, do ácido ferúlico e do tensoativo polissorbato 80 (Tween[®] 80), excluindo os demais componentes, conforme apresentado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa micropartículas}}{\text{massa (polímero + ácido ferúlico + polissorbato 80)}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.4.2.2 Sistema S2

Para as formulações do sistema S2, o rendimento foi calculado pela razão entre a massa recuperada a partir da secagem por aspersão das micropartículas pela soma das massas do polímero e do ácido ferúlico, como indicado na Equação 2.

$$R = \frac{\text{massa micropartículas}}{\text{massa (polímero + ácido ferúlico)}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.4.2.3 Sistema S3

O rendimento (R) das formulações do sistema S3 foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação da dispersão sólida, pela soma das massas utilizadas do polímero e do ácido ferúlico, conforme apresentado na Equação 3.

$$R = \frac{\text{massa obtida de dispersão sólida}}{\text{massa inicial (polímero + ácido ferúlico)}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.4.3 Determinação do Teor de Umidade

O conteúdo de água presente no ácido ferúlico, nos polímeros, nas micropartículas dos sistemas S1 e S2 e nas dispersões sólidas (sistema S3) foi avaliada no analisador de umidade por infravermelho (Shimadzu, modelo MOC63u, Quioto, Japão). Previamente, a termobalança foi calibrada, conforme as indicações do fabricante.

Para cada amostra, uma massa, de aproximadamente 1,0 g, foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105 °C, durante um período de tempo variável, até massa constante. O valor em porcentagem referente à perda de massa foi calculado como sendo o teor de umidade da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata para as formulações dos sistemas S1, S2 e S3.

4.4.4 Determinação do Ácido Ferúlico Incorporado nos Sistemas Poliméricos

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg.g^{-1}) foi determinada para os sistemas poliméricos a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Varian Pro-star SYS-LC-240-E (Palo Alto, CA, EUA) dotado de detector na região do ultravioleta, conforme os parâmetros estabelecidos na Tabela 4.

TABELA 4 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO POR CLAE

Características	Descrição
Detecção	UV ($\lambda = 320 \text{ nm}$)
Fluxo	$1,0 \text{ mL.min}^{-1}$
Coluna	Varian C ₁₈ analytical column (250 x 4,6 mm, 5 μm)
Fase móvel	Água ajustada para pH 3,0 com ácido <i>ortho</i> -fosfórico 0,1N e metanol (52:48, v/v)
Volume de injeção	10 μL
Tempo de análise	9 min

Previamente, o método analítico passou pelo processo de validação analítica, conforme descrito a seguir.

4.4.4.1 Validação do método analítico para a quantificação do ácido ferúlico

A validação do método analítico por CLAE foi realizada segundo os critérios propostos pelo ICH (*International Conference on Harmonization of the technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*) (2005).

Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, sendo os

ensaios efetuados por CLAE em sistema Varian Pro-star SYS-LC-240-E dotado de detector de ultravioleta, no comprimento de onda de 320 nm. Os dados foram analisados pelo software *Workstation chromatography* (Palo Alto, CA, EUA).

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas das micropartículas do sistema S1 preparadas sem o fármaco (M1AF0 e M2AF0) em comparação com os obtidos para as micropartículas que contém o ácido ferúlico (M1AF10 e M2AF10) ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com o objetivo de confirmar que nenhum dos excipientes interferiu na quantificação do fármaco.

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas três curvas analíticas, com sete níveis de concentração (10, 20, 30, 40, 50, 60 e $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$), utilizando metanol como solvente. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados, por meio da relação entre o desvio padrão da curva analítica e a sua inclinação, usando os fatores multiplicadores sugeridos pela norma ICH (2005), conforme demonstrado nas Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 4})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo, LD, o limite de detecção; LQ, o limite de quantificação; DP, o desvio padrão da curva analítica; e B, o coeficiente angular.

Para avaliar a repetibilidade do método analítico, três concentrações diferentes (15 , 45 e $65 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram analisadas em triplicata, totalizando nove determinações, sendo o resultado expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia.

A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre as determinações de uma mesma concentração ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em triplicata, mas realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada por meio do método de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida de fármaco ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à solução-amostra,

resultando nas concentrações de 15, 45 e 65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

Para a avaliação da robustez, as micropartículas do sistema S1 (M1AF10 e M2AF10) ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, de temperatura da coluna analítica e pH da fase móvel e avaliadas em triplicata.

O fluxo foi modificado de 1 mL.min^{-1} para $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$ e $1,1 \text{ mL.min}^{-1}$. A temperatura da coluna analítica foi alterada de 25°C para 30°C e 40°C . O pH da fase móvel foi de 3,0 para 4,0 e 6,0. Os resultados de cada parâmetro foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos para a condição padrão.

As soluções-amostra utilizadas para a avaliação da repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez foram preparadas a partir da formulação M1AF10, quando da validação do método analítico para o sistema S1M1 e da formulação M2AF10, quando da análise de validade do método analítico para o sistema S1M2.

4.4.4.2 Estudo de degradação forçada

Estudos de degradação forçada foram realizados com o objetivo de fornecer informações sobre a estabilidade do fármaco e a especificidade do método proposto. A solução padrão de AF foi submetida à degradação acelerada pelas condições ácidas, básicas e fotolíticas (BLESSY et al., 2014).

Para investigar a degradação ácida, 6,25 mL de solução-mãe padrão ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi diluída em um frasco volumétrico de 25 mL com 0,1 M de HCl. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e ao abrigo da luz durante 1 h. Após o tempo de reação, a solução foi neutralizada com uma solução de NaOH 0,1 M. A solução foi diluída com metanol para se obter uma concentração final de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ antes da injeção no sistema de CLAE. O mesmo procedimento foi utilizado para a degradação alcalina, exceto pelo fato de que a solução de HCl 0,1 M foi substituída por 0,1 M de NaOH durante o preparo da amostra.

Para a fotodegradação, 3 mL de uma solução metanólica de AF (1 mg.mL^{-1}) foi colocada numa cubeta de quartzo e subsequentemente exposta à radiação UV (Phillips TUV lâmpada-254 nm, 30 W) durante 6 h numa câmara espelhada (1 m x 25 cm x 25 cm), a uma distância fixa. Em períodos pré-determinados (0, 1, 2, 3, 4, 5

e 6 h) de exposição à luz, 400 µL das amostras foram retiradas e diluídas com metanol (concentração final de 40 µg.mL⁻¹ de AF), a fim de quantificar a quantidade remanescente de AF utilizando o método de CLAE descrito anteriormente. Para excluir a possibilidade da ocorrência de uma degradação térmica, uma cubeta contendo uma solução metanólica de AF (concentração final de 40 µg.mL⁻¹ de AF) foi coberta por papel de alumínio e avaliada da mesma forma. A cinética de fotodegradação do AF foi determinada e o melhor ajuste matemático foi utilizado para indicar a constante da reação. Os modelos cinéticos utilizados foram: ordem zero ($C = C_0 - kt$), primeira ordem ($\ln C = \ln C_0 - kt$) e segunda equação ordem ($1/C = 1/C_0 + kt$).

4.4.4.3 Eficiência de encapsulação/incorporação

Considerando os resultados obtidos na quantificação do ácido ferúlico, a eficiência de encapsulação (EE %) ou taxa de incorporação foi calculada a partir da diferença entre a massa de fármaco inicialmente adicionado em cada formulação e a massa presente nas formulações (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008), conforme demonstrado na Equação 6.

$$EE = \frac{\text{massa de AF nas micropartículas / dispersões sólidas}}{\text{massa inicial (teórica) do ácido ferúlico}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

4.4.5 Estudo de Solubilidade

Estudos de solubilidade foram realizados para o AF puro e para as dispersões sólidas do sistema S3. Uma amostra contendo AF em quantidade que excedeu a sua solubilidade (15 mg de AF) foi adicionada a um balão volumétrico contendo água purificada (25 mL) e mantido sob agitação magnética a 150 rpm em temperatura ambiente (20 ± 2 °C) durante 48 h. A suspensão resultante foi filtrada através de um filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (membrana Durapore®, 0,22 µm de tamanho de poro, Millipore, Bedford, MA, EUA). A concentração final de AF foi determinada espectrofotometricamente a 320 nm e a solubilidade de cada amostra foi então calculada em triplicata. A solubilidade relativa

do AF a partir das dispersões sólidas obtidas por secagem por aspersão foi relatada em porcentagem comprada ao fármaco puro, como média e desvio padrão.

4.4.6 Caracterização Físico-química dos Sistemas Poliméricos

4.4.6.1 Análises morfológicas e de superfície

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas, pertencentes aos sistemas S1 a S3, foi realizada no microscópio eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu Co.). As micropartículas foram levadas à estufa a vácuo TE 395 (Tecnal) e fixadas em suporte metálico. Após, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (Shimadzu Co.). As micrografias foram obtidas em diferentes magnificações, após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do software específico.

4.4.6.2 Determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica

O tamanho de partícula das formulações que integram o sistema S1 foi avaliado por espectrometria de difração a laser, utilizando um granulômetro a laser CILAS 920L, com faixa de análise entre 0,3 a 400 μm .

As amostras pulverizadas e secas foram dispersas em água destilada e sonicadas por 1 min, antes de ser realizada a medida. A partir da suspensão homogênea obtida, por meio do software específico, The Particle Expert® (versão 5.12, Cilas, Marseille, França), o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados.

A distribuição do tamanho das partículas que compõe o sistema S2 foi estimada medindo cerca de 200 partículas que apresentaram um formato esférico em áreas arbitrárias das micrografias, utilizando o software Image Tool (versão 3.0, San Antonio, Texas, EUA).

O *span*, valor matemático definido como a medida da dispersão granulométrica (CHEN; DAVIS, 2002), que avalia a variação do volume de distribuição das partículas em relação ao diâmetro médio, foi calculado a partir da Equação 7.

$$span = \frac{d_{(v,90)} - d_{(v,10)}}{d_{(v,50)}} \quad (\text{Equação 7})$$

Sendo, $d(v,10)$, $d(v,50)$ e $d(v,90)$, respectivamente, o diâmetro das partículas correspondente a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada para a amostra.

4.4.6.3 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

Os sistemas poliméricos S1, S2 e S3 foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% em massa), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu Co.), 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) das dispersões sólidas e das micropartículas foram avaliados frente aos espectros do fármaco, dos polímeros de partida e das misturas físicas.

4.4.6.4 Análise por difração de raios X

As formulações de dispersões sólidas e micropartículas poliméricas, o ácido ferúlico puro, os polímeros de partida e as misturas físicas foram examinadas em difratômetro de raio X Shimadzu XRD-6000, scan de 2°.min⁻¹ e 2 θ de 5° a 80°, radiação K α de cobre ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade (CANEVAROLO JR., 2004).

4.4.6.5 Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras do sistema S2 e S3 foi estudada por meio das curvas de ATG, que foram obtidas na faixa de temperatura entre 25–900 °C. Para isso, foi empregada uma termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob razão dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), empregando uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em cadinho de platina contendo aproximadamente $5,0 \pm 0,1$ mg da amostra. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

A curva de calorimetria exploratória diferencial (CED) foi elaborada para o ácido ferúlico, para o Eudragit® L100, para a mistura física e para as micropartículas do sistema S2, na faixa de temperatura entre 25 e 220 °C. Foi utilizada uma célula calorimétrica da marca Shimadzu, modelo DSC-60, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sendo que a

amostra ($2,5 \pm 0,1$ mg) foi acondicionada em cápsula de alumínio fechada. O equipamento foi previamente calibrado com índio (p.f. = $156,45$ °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54$ J.g⁻¹) e zinco (p.f. = $419,45$ °C).

4.4.7 Estudo de Liberação *In Vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram conduzidos para o ácido ferúlico puro e para as formulações dos sistemas S2 e S3. Para tanto, foi empregado o dissolutor de cubas 299/6 (Nova Ética), mantendo a temperatura do sistema em $37 \pm 0,5$ °C, a agitação em 50 rev.min⁻¹. Para o sistema S2 foi utilizado o aparato 1 (cesta) por um período total de 120 min e para o sistema S3 o aparato 2 (pá) pelo tempo de 150 min. O meio de dissolução utilizado foi o tampão fosfato pH = 7,0 (50 mM), em volume de 900 mL. Em intervalos de tempo pré-determinados, amostras de 10 mL foram coletadas, com a reposição do meio de dissolução em igual volume, e analisadas em 320 nm no espectrofotômetro UV-Vis Genesys 10 UV Scanning de acordo com a curva de calibração previamente determinada (2 a 12 µg.mL⁻¹, $y = 0,077x + 0,0027$, $r = 0,999$). Todo o procedimento foi realizado em triplicata, na ausência de luz.

No sistema S3 o fármaco puro e as dispersões sólidas foram utilizados como comprimidos. Para tanto, uma quantidade exata de dispersão sólida (equivalente a 15 mg de AF) foi comprimida utilizando uma prensa hidráulica de laboratório (Perkin Elmer, modelo 15011, Norwalk, CT, EUA). A compressão direta foi realizada em 3 t.cm⁻² durante 2 min. Os comprimidos ($n = 6$) foram preparados sem qualquer adição de excipientes farmacêuticos.

4.4.7.1 Avaliação dos perfis de liberação

Os perfis de liberação *in vitro* foram obtidos plotando-se a porcentagem de ácido ferúlico liberada em função do tempo. Posteriormente, esses resultados foram analisados por meio do teste da razão (eficiência de dissolução) e dos métodos modelo-dependentes.

A eficiência de dissolução (ED) do ácido ferúlico foi determinada segundo Lima (2013) e comparada com a eficiência de dissolução das diferentes formulações de micropartículas. A eficiência de dissolução é uma avaliação modelo-independente, definida pela área sob a curva de dissolução e expressa como a

percentagem da área de um retângulo que descreve 100% da dissolução, em um determinado período de tempo (Equação 8).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\% \quad (\text{Equação 8})$$

Na qual: y é a porcentagem de fármaco dissolvido no tempo t.

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 9), ao modelo biexponencial (Equação 10), ao modelo de ordem zero (Equação 11) e ao modelo de Weibull (Equação 12), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 9})$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \quad (\text{Equação 10})$$

$$\%D = kt \quad (\text{Equação 11})$$

$$\%D = 100[1 - e^{-(t/T_d)^b}] \quad (\text{Equação 12})$$

Na qual: porcentagem de dissolução (%D), percentual do fármaco dissolvido no tempo t; k, α e β , constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B, concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; T_d, tempo no qual 63,2% do fármaco é dissolvido; b, parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 13) ou lei das potências foi também aplicado, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n, com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco a partir das formulações do sistema S2.

$$f_t = at^n \text{ (Equação 13)}$$

Na qual: a , constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n , expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; f_t , fração do fármaco dissolvido no tempo t .

Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento (ou erosão) do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

Os métodos modelo-dependentes destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software MicroMath Scientist® (versão 2.01, Saint Louis, Estados Unidos).

4.4.8 Estudo do Potencial Antioxidante

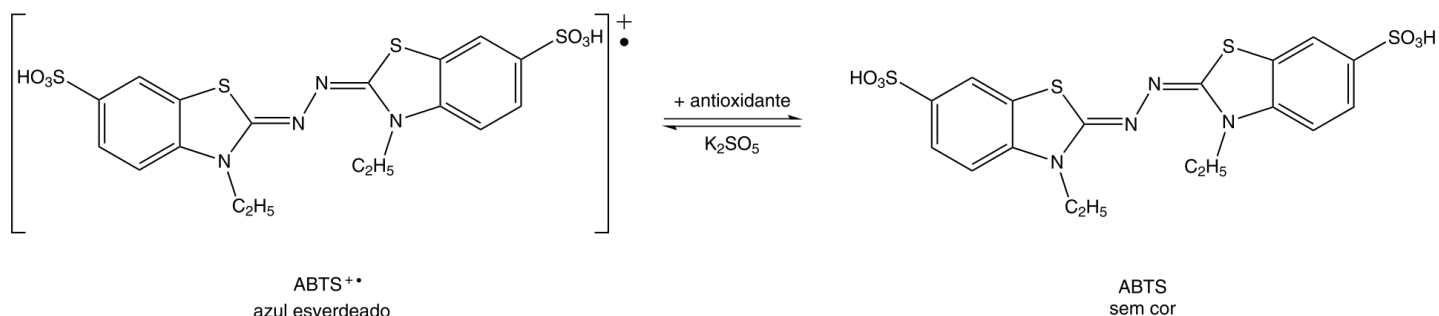
A atividade antioxidante total do ácido ferúlico presente nas dispersões sólidas (sistema S3) foi determinada pelo ensaio de descoloração do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (ABTS•⁺) (Figura 9).

Soluções aquosas do fármaco puro e da dispersão sólida (PEG 6000 10%), contendo as mesmas concentrações de ácido ferúlico foram preparadas 30 min antes do início dos experimentos e mantidas na ausência de luz.

Resumidamente, soluções aquosas de ABTS (7 mmol.L⁻¹) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L⁻¹) foram misturadas em uma proporção volumétrica de 1:1 e incubadas na ausência de luz, à temperatura ambiente por 12 h, para a obtenção do radical catiônico ABTS•⁺ (RE et al., 1999). Em seguida, a solução de ABTS•⁺ foi diluída em 50 mmol.L⁻¹ de uma solução tampão de fosfato de sódio (pH = 7,4), para obter um valor de absorvância de $\pm 0,7$ a 734 nm. A reação entre o ABTS•⁺ e o ácido ferúlico puro ou as dispersões sólidas (PEG 6000 10%) foi medida pelo decréscimo

da absorvância em 734 nm, após 30 min, em um leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES, SpectraMax 190, Sunnyvale, USA).

FIGURA 9 – REAÇÃO DE REDUÇÃO DO RADICAL ABTS POR UM ANTIOXIDANTE



FONTE: Rufino et al. (2007)

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e as dispersões sólidas elaboradas sem a adição do ácido ferúlico (PEG 6000 0%) foram utilizadas como controle negativo. A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de acordo com a Equação 14.

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{(Ab - Aa)}{Ab} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 14})$$

Na qual: Ab é a absorvância do controle e Aa é a absorvância da amostra.

4.4.9 Ensaios *In Vitro* de Cultivo Celular

O sistema S2 foi submetido a ensaios baseados em cultivo celular, a fim de determinar o potencial citotóxico, citoprotetor, imunomodulador e inibidor da geração de espécies reativas de oxigênio das formulações.

4.4.9.1 Cultivo celular

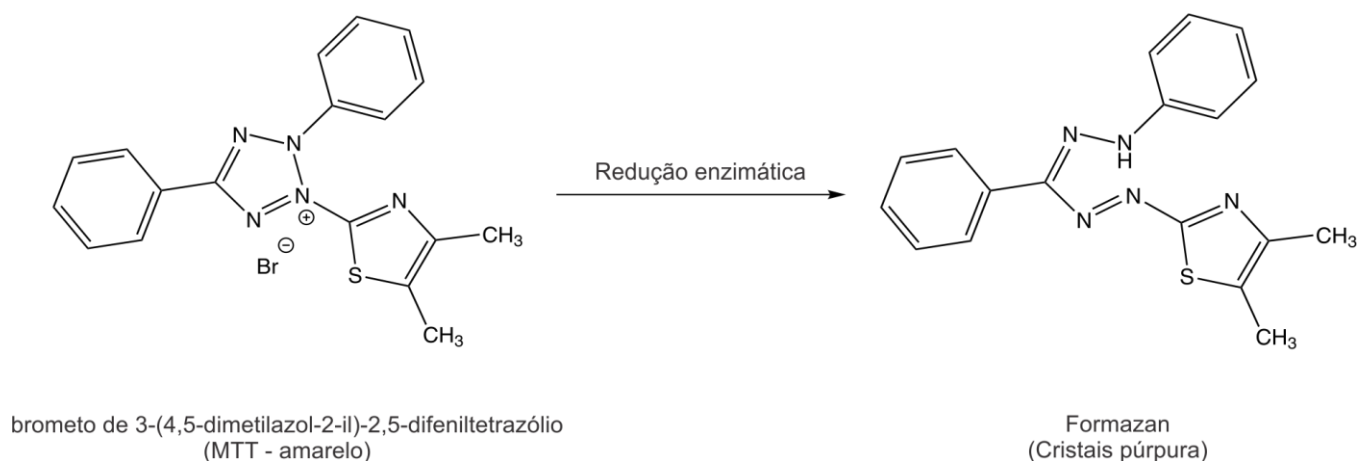
A linhagem celular de macrófago J774A.1 foi rotineiramente cultivada em frascos de cultura de plástico de 75 cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 24 mM de NaHCO₃, 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg.mL⁻¹), mantidas a 37 °C em estufa

com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 2-4 dias, as células foram desprendidas do frasco de cultura, sendo centrifugadas durante 5 minutos a 125 x g. As células foram resuspensas em meio fresco e plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹) em placas de multi-poços apropriados (24 ou 96 poços). Os experimentos foram realizados quando as células atingiram cerca de 70% de confluência. As células J774A.1 foram cedidas pela Profa. Dra Carla Cristine Kanunfre da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.4.9.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

A viabilidade celular foi determinada através da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] a formazan (MOSMANN, 1983) (Figura 10).

FIGURA 10 – REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT A CRISTAS DE FORMAZAN



FONTE: O autor (2016).

As células J774A.1 foram semeadas em placas de 96 poços. Após a adesão, as células foram incubadas por 48 h a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ em meio de cultura contendo o ácido ferúlico puro ou a formulação M3AF10 em concentrações equivalentes a 25, 50, 100 e 200 µM de fármaco. O AF foi solubilizado em meio de cultura contendo 0,05% de DMSO, filtrada em membrana esterilizante, enquanto que as micropartículas foram dispersas apenas em meio RPMI 1640 suplementado.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e sobre as células foi adicionada uma solução de brometo 3-(4,5-dimetil- 2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT) a 0,5 mg.mL⁻¹ em meio de cultivo (RPMI 1640) acrescido de

10% de soro fetal bovino (SFB) durante 30 min. Em seguida, o formazan foi dissolvido em DMSO para a solubilização dos cristais formados e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 546 nm, foi realizada em leitor de microplacas híbrido multi-modo Synergy H1 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). As células não tratadas em meio de cultura foram utilizadas como controle. Células J774A.1 em meio de cultura contendo 0,05% de DMSO foram testadas como veículo. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao respectivo controle.

4.4.9.3 Ensaio de citoproteção

As células foram semeadas em placas de 24 poços. Após o período de adesão, as células foram incubadas na presença do ácido ferúlico puro ou da formulação M3AF10 em concentrações finais equivalentes a 50, 100 e 200 μM durante 48 h. Após a incubação, as células foram desprezadas e o sobrenadante foi submetido a uma exposição aguda (1 h) de 600 μM de H_2O_2 em tampão salina fosfato (a concentração de peróxido de hidrogênio que anteriormente promoveu uma redução de 50% da viabilidade das células). Após este tratamento, o tampão salina fosfato foi removido e as células foram incubadas durante 30 min em solução de MTT (0,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). O formazan foi dissolvido em DMSO e a absorvância foi medida utilizando um leitor de microplacas híbrido multi-modo Synergy H1 (546 nm). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle, que não foi submetido à exposição de H_2O_2 .

4.4.9.4 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi estimada de maneira indireta através da quantificação do nitrito, produto estável da conversão do óxido nítrico, utilizando-se o método colorimétrico de Griess (DING; NATHAN; STUEHR, 1988). As células J774A.1 foram semeadas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas na presença do ácido ferúlico puro ou da formulação M3AF10 em concentrações finais equivalentes a 50 e 100 μM . As células foram incubadas por 96 h a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 . A produção de NO foi estimulada pela adição de 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de LPS de *Escherichia coli*. Após a incubação das células, 100 μL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços. Um volume de 100 μL do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 5%, v/v, em

água destilada mais α -naftiletilenodiamina 0,1%, em água destilada) foi acrescentado aos sobrenadantes à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi determinada utilizando um leitor de microplacas híbrido multi-modo Synergy H1 a 550 nm. Uma curva analítica para a determinação de nitrito foi previamente obtida utilizando nitrito de sódio como padrão. O controle não foi submetido ao LPS.

4.4.9.5 Ensaio para a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada através de um composto fluorogênico diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). A fim de determinar a produção de ROS intracelular, as células foram semeadas em placas pretas de 96 poços. Após a adesão, as células foram incubadas na presença do ácido ferúlico puro ou da formulação M3AF10 em concentrações finais equivalentes a 50 e 100 μ M. As culturas foram mantidas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ durante 24 h. As células foram então incubadas com DCFH-DA (25 μ M) durante 60 min em meio RPMI 1640 incolor (sem vermelho de fenol) suplementado com 1% de soro fetal de bovino a 37 °C na ausência de luz. Após o período de incubação, a intensidade de fluorescência promovida pela formação do composto 2'-7' diclorofluoresceína (DCF) foi mensurada a cada 10 min por meio de um leitor de microplacas híbrido multi-modo Synergy H1, no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm.

4.4.10 Ensaio *In Vivo* da Atividade Antiagregante Plaquetária

A formulação de dispersão sólida PEG 6000 10% (sistema S3) e a formulação M3AF10 (sistema S2) foram selecionadas para o estudo *in vivo* do potencial do ácido ferúlico como um agente antiagregante plaquetário por apresentarem morfologia apropriada, eficiência de encapsulação/incorporação elevada, amorfização do ácido ferúlico e perfil de liberação imediata ou controlada.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEPG), sob o protocolo de número 017/2013 (**ANEXO 1**), em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4.10.1 Animais

O ensaio para avaliação da atividade antiplaquetária foi realizado utilizando ratos Wistar machos, pesando cerca de 200 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com acesso *ad libitum* a ração e água em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12/12 h).

4.4.10.2 Protocolo experimental

4.4.10.2.1 Sistema S2

Trinta e dois ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais cada. O Grupo 1 recebeu a micropartícula sem o fármaco M3AF0 (massa equivalente ao grupo 3, por via oral), ao Grupo 2, foi administrado o fármaco puro (30 mg.kg^{-1} , por via oral), o Grupo 3 recebeu a formulação de micropartículas de Eudragit® L100 M3AF10 (quantidade equivalente a 30 mg.kg^{-1} de ácido ferúlico, por via oral) e o grupo 4 recebeu aspirina como agente antiplaquetário padrão (30 mg.kg^{-1} , por via oral). Estes tratamentos foram realizados durante 10 dias consecutivos, com administração oral por gavagem gástrica, uma vez ao dia. Seis horas após a última dose administrada os ratos foram anestesiados com quetamina e xilazina (55 e 8 mg.kg^{-1} , respectivamente) e a sua artéria carótida direita foi canulada para retirada da amostra de sangue. Finalmente, os ratos foram sacrificados utilizando uma sobredosagem anestésica.

4.4.10.2.2 Sistema S3

Trinta e dois ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais cada. O Grupo 1 recebeu a formulação PEG 6000 0% (massa equivalente ao grupo 3, por via oral), ao Grupo 2, foi administrado o fármaco puro (30 mg.kg^{-1} , por via oral), o Grupo 3 recebeu a formulação de dispersão sólida PEG 6000 10% (quantidade equivalente a 30 mg.kg^{-1} de ácido ferúlico, por via oral) e o grupo 4 recebeu aspirina como agente antiplaquetário padrão (30 mg.kg^{-1} , por via oral). Estes tratamentos foram realizados durante 10 dias consecutivos, com administração oral por gavagem gástrica, uma vez ao dia. Uma hora após a última dose administrada os ratos foram anestesiados com quetamina e xilazina (55 e 8 mg.kg^{-1} , respectivamente) e a sua artéria carótida direita foi canulada para retirada

da amostra de sangue. Finalmente, os ratos foram sacrificados utilizando uma sobredosagem anestésica.

4.4.10.3 Preparação de plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP)

O sangue fresco (6 mL) foi colhido em tubos contendo 4% de solução de citrato trissódico. As amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente durante 15 min a 100 xg para obter o PRP. O plasma foi cuidadosamente removido e centrifugado a 900 xg durante 10 min para obter um pellet de plaquetas que foi re-suspenso em plasma autólogo fresco suficiente. O sobrenadante a partir da centrifugação final foi o plasma pobre em plaquetas (PPP).

4.4.10.4 Teste de agregação plaquetária

O ensaio de agregação de plaquetas foi realizado numa placa de 96 cavidades e a absorbância foi obtida utilizando um leitor de microplacas híbrido multi-modo Synergy H1 a 650 nm. Um agonista (colágeno do tipo I, 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionado em cada poço. Então, o plasma que contém plaquetas a uma concentração de 200×10^6 plaquetas/cavidade foi adicionado para um volume final de 150 μL . As leituras foram tomadas no tempo zero e depois de 15 min para induzir a agregação plaquetária. A placa foi agitada durante 10 s antes do início de cada ensaio, com uma amplitude de 2 mm (174 rpm) e 3 s antes de cada leitura e com uma amplitude de 1 mm (114 rpm) a 37 °C.

4.4.10.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism (versão 5.00, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As comparações entre grupos foram testadas por ANOVA de uma via. Para os ensaios *in vitro* baseados em cultura de células, foi realizado o teste de Tukey. O teste de Bonferroni *post hoc* foi utilizado para o ensaio *in vivo* de agregação plaquetária. Nível crítico de significância foi fixado em $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SISTEMA S1: MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO, OBTIDAS PELO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO, A PARTIR DO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO) E POLI- ϵ -CAPROLACTONA

As micropartículas de PHBV que compõem o sistema S1M1 (M1AF0, M1AF5, M1AF10 e M1AF20) e as micropartículas de PCL do sistema S1M2 (M2AF0, M2AF5, M2AF10 e M2AF20) foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples (O/A) e evaporação do solvente orgânico. Após a secagem, os materiais do sistema S1M1 apresentaram um aspecto macroscópico pulverulento de cor amarelo-pálido, tonalidade semelhante àquela observada para o PHBV puro. Para o sistema S1M2, foi verificado um aspecto físico de pó quase branco.

5.1.1 Rendimento

Os rendimentos foram calculados com base na Equação 1 para as micropartículas do sistema S1. A Tabela 5 sumariza os resultados percentuais, apresentados na forma de valor médio e desvio padrão.

TABELA 5 – RENDIMENTO* OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES DOS SISTEMAS S1M1 E S1M2, A PARTIR DO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

Formulação	Ácido ferúlico inicial (g)	Rendimento (%)
M1AF0	—	75,8 \pm 1,4
M1AF5	0,100	65,4 \pm 5,2
M1AF10	0,200	67,9 \pm 3,5
M1AF20	0,400	60,9 \pm 2,3
M2AF0	—	65,8 \pm 5,2
M2AF5	0,100	63,0 \pm 2,9
M2AF10	0,200	65,1 \pm 6,4
M2AF20	0,400	62,5 \pm 4,7

* média (n = 3) \pm desvio padrão

Todas as formulações revelaram um rendimento superior a 60%, o que pode ser considerado aceitável a partir do método empregado. Tanto para o sistema

S1M1, quanto para o sistema S1M2, as micropartículas elaboradas com a quantidade de fármaco correspondente a 10% de ácido ferúlico apresentaram um melhor rendimento, sendo 67,9% para a formulação M1AF10 e 65,1% para a formulação M2AF10.

5.1.2 Determinação do Teor de Umidade

A Tabela 6 fornece os resultados referentes ao teor de água presente nas micropartículas que integram os sistemas M1 e M2, frente aos valores obtidos para o ácido ferúlico (1,47%), PHBV (1,29%) e PCL (1,12%).

Para o sistema S1M1, foi verificado que as micropartículas apresentaram um teor de umidade semelhante ao do fármaco puro, variando entre 1,26% e 1,40%, respectivamente para as formulações M1AF10 e M1AF20. Valores de umidade, próximos aos materiais de partida, foram obtidos para as micropartículas do sistema S1M2, entre 1,08% (formulação M2AF5) e 1,48% (formulação M2AF0). Esses resultados indicam que o processo de secagem em estufa a 35 ± 2 °C foi efetivo na remoção da água empregada no processo de microencapsulação.

TABELA 6 – TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ÁCIDO FERÚLICO, PARA O PHBV, PARA A PCL E PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1 (M1 E M2)

Material	Umidade (%)
Ácido ferúlico	$1,47 \pm 0,12$
PHBV	$1,29 \pm 0,17$
PCL	$1,12 \pm 0,12$
M1AF0	$1,39 \pm 0,15$
M1AF5	$1,29 \pm 0,06$
M1AF10	$1,26 \pm 0,07$
M1AF20	$1,40 \pm 0,12$
M2AF0	$1,48 \pm 0,13$
M2AF5	$1,08 \pm 0,11$
M2AF10	$1,28 \pm 0,08$
M2AF20	$1,10 \pm 0,14$

* média (n = 3) \pm desvio padrão

A quantidade de água residual nos pós tem grande influência sob a sua estabilidade física, ao mesmo tempo em que controla a magnitude das forças capilares responsáveis pela agregação das partículas (BOSQUILLON et al., 2004). Dessa forma, o teor de água tem relevância para prever possíveis alterações nos

materiais elaborados. Considerando que os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma umidade reduzida, é possível estabelecer que essa água residual tenha pouca interferência na estabilidade física das micropartículas.

5.1.3 Determinação do Ácido Ferúlico Incorporado nas Micropartículas e Eficiência de Encapsulação

5.1.3.1 Desenvolvimento e otimização do método analítico

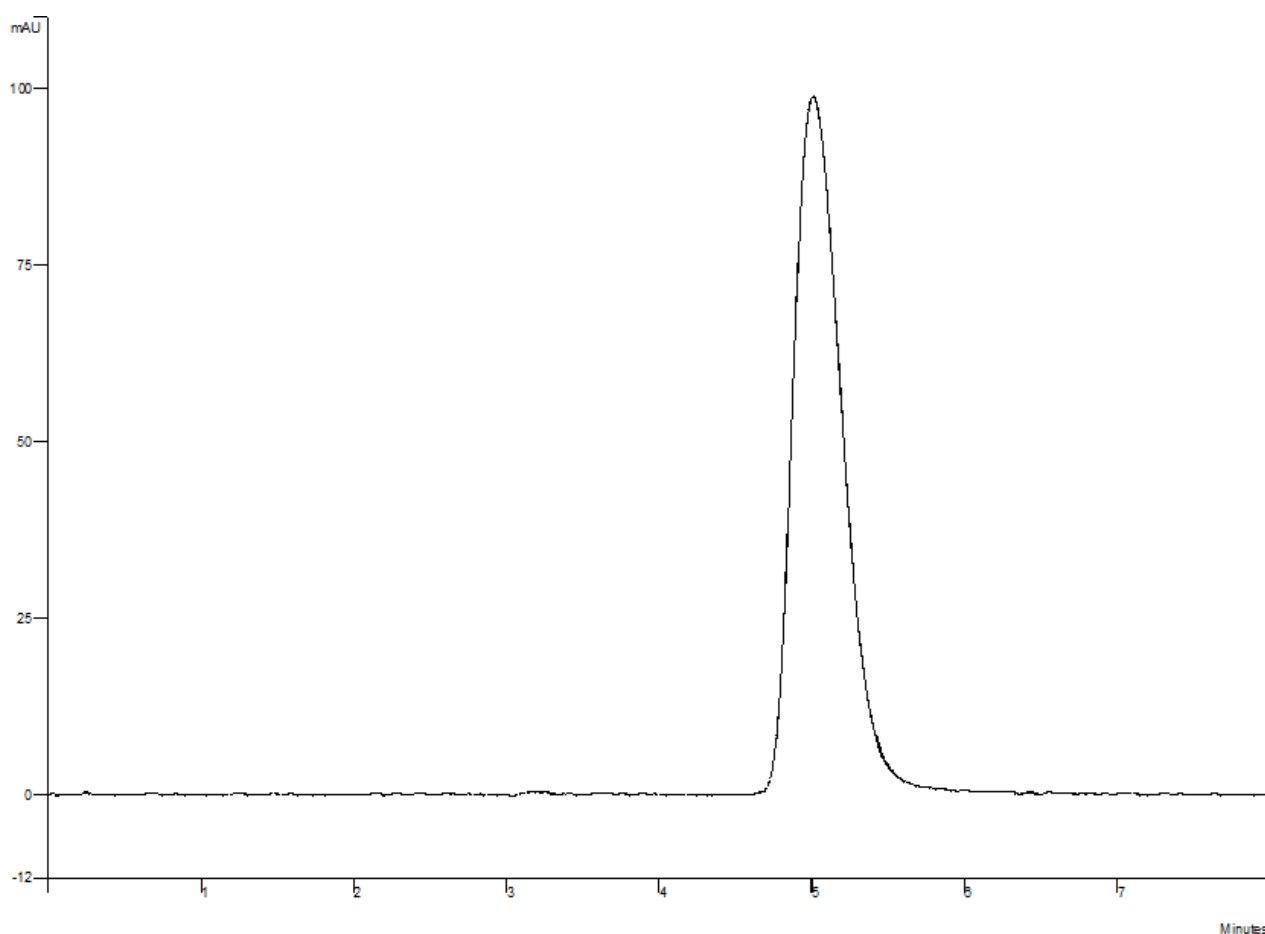
Testes preliminares foram realizados a fim de elaborar um método rápido e eficaz para a quantificação do AF utilizando CLAE. As condições cromatográficas foram investigadas, principalmente relacionadas com a composição da fase móvel. Corridas iniciais foram realizadas utilizando uma fase móvel contendo acetonitrila: água (16:84 v/v) adicionada de ácido acético glacial a 1% baseado em um método anteriormente relatado para a quantificação de AF no plasma (LI & BI 2003). No entanto, picos irregulares foram observados, mostrando uma baixa resolução cromatográfica, provavelmente devido a diferenças instrumentais e de coluna analítica.

A fim de melhorar a qualidade do método cromatográfico, várias proporções em modo isocrático foram testadas usando diferentes misturas de acetonitrila: metanol:água ajustado a pH 3,0 com ácido acético. Estes ensaios demonstraram que a proporção de acetonitrila:metanol:água ajustado a pH 3,0 com ácido acético (24:24:52 v/v) era mais adequada para a otimização deste método. Picos cromatográficos simétricos de AF foram observados, porém, não foi possível estabelecer uma repetibilidade e precisão do método utilizando esta proporção de fase móvel.

Portanto, ensaios adicionais foram realizados removendo a acetonitrila da fase móvel e o ácido acético foi substituído pelo ácido *ortho*-fosfórico (0,1 N) como agente acidificante do meio e testado em diferentes valores de pH. A fase móvel composta por água ajustada para pH 3,0 usando ácido *ortho*-fosfórico 0,1 N e metanol (52:48 v/v) proporcionou uma cauda inferior e um pico mais simétrico do AF com um menor tempo de retenção (pratos teóricos = 1253, k' = 3,77 e fator de assimetria = 1,3). O pico foi detectado em 4,86 min (Figura 11), o que é adequado para análises de rotina.

Resumindo, a fase móvel água ajustada para pH 3,0 usando ácido *ortho*-fosfórico 0,1 N e metanol (52:48 v/v), temperatura da coluna de 25 ± 2 °C, volume de injeção de amostra de 10 μ L, fluxo isocrático de 1,0 mL.min⁻¹, detector ajustado a 320 nm, e tempo de análise de 8 min foram escolhidos como as condições cromatográficas adequadas para os procedimentos adicionais, incluindo a validação do método.

FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DE CLAE CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE ÁCIDO FERÚLICO (40 μ g.mL⁻¹). FASE MÓVEL: ÁGUA AJUSTADA PARA PH 3,0 USANDO ÁCIDO *ORTHO*-FOSFÓRICO 0,1 N E METANOL (52:48 v/v); FLUXO: 1,0 mL.min⁻¹; COMPRIMENTO DE ONDA DE DETECÇÃO: 320 nm; TEMPERATURA DA COLUNA: 25 ± 2 °C E VOLUME DE INJEÇÃO: 10 μ L.



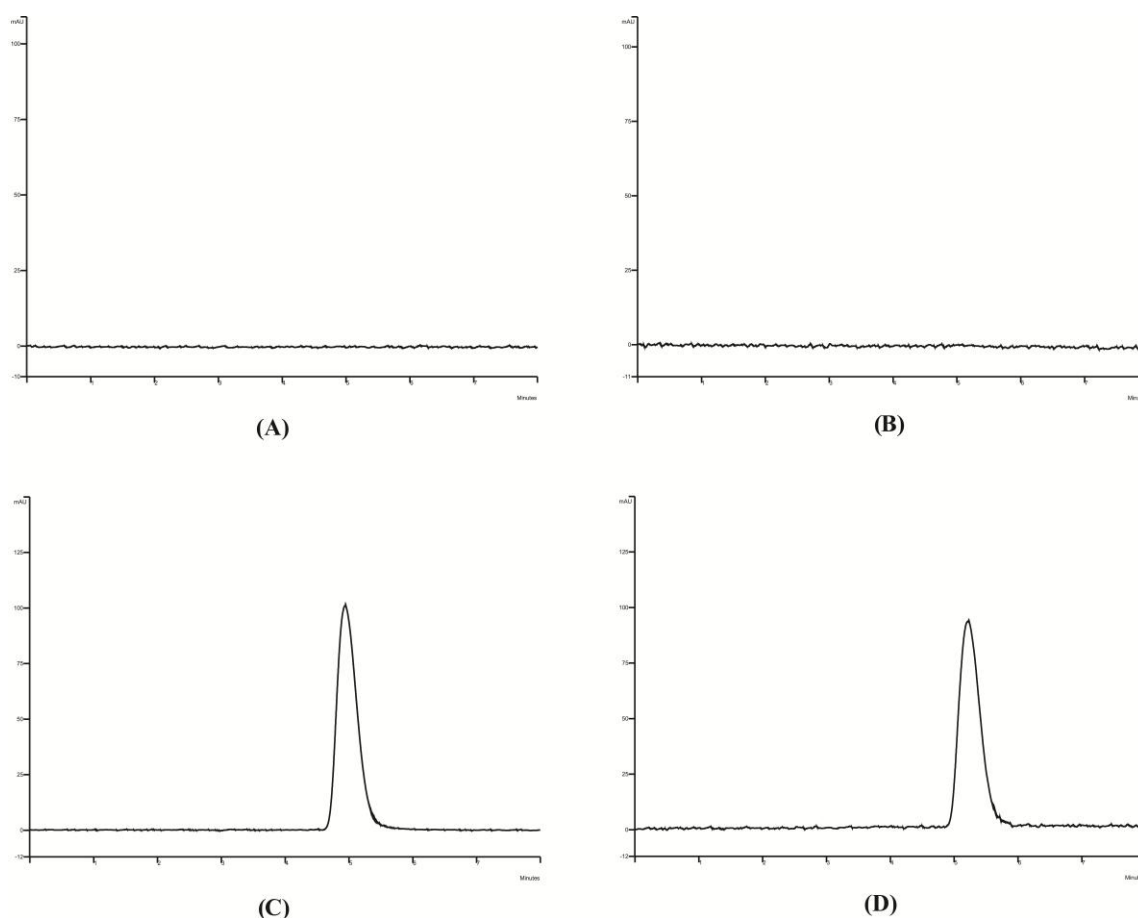
FONTE: O autor (2016).

5.1.3.2 Validação do método analítico para a quantificação do ácido ferúlico

Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez (ICH, 2005).

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas das micropartículas do sistema S1 preparadas sem o fármaco (M1AF0 e M2AF0) em comparação com os obtidos para as micropartículas que contém o ácido ferúlico (M1AF10 e M2AF10). Os resultados mostraram que não houve interferência no tempo de retenção do AF com a adição de excipientes na formulação. Neste sentido, é possível confirmar a especificidade do método proposto (Figura 12). Além disso, o detector de arranjo de diodos indicou que o pico cromatográfico do AF não apresentou interferentes (índice de pureza > 0,9999).

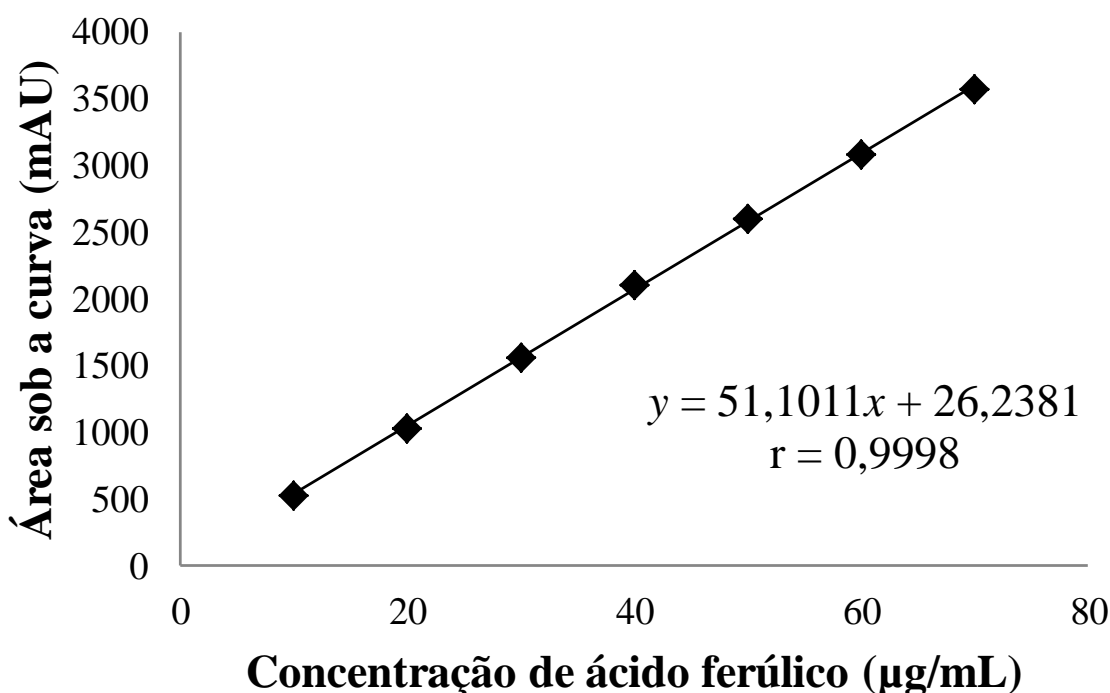
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS ($\lambda = 320$ nm) DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1 PREPARADAS SEM O FÁRMACO: M1AF0 (A), M2AF0 (B); EM COMPARAÇÃO COM O DAS MICROPARTÍCULAS QUE CONTÉM O ÁCIDO FERÚLICO: M1AF10 (C) E M2AF10 (D)



FONTE: O autor (2016).

A Figura 13 ilustra a curva analítica média obtida para quantificação do fármaco em solução metanólica, apresentando a equação da reta e o valor do r médio encontrado na faixa de concentração de 10,0 a 70,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação linear obtida pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 51,1011x + 26,2381$, onde y é a área do pico e x é a concentração da solução padrão em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O estudo de linearidade revelou um valor de coeficiente de correlação (r) médio igual a 0,9998, indicando uma regressão linear significativa.

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO OBTIDA POR CLAE NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 10 A 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($n = 3$)



FONTE: O autor (2016).

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio das Equações 4 e 5, respectivamente. Os valores obtidos foram 0,334 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o limite de detecção e 1,012 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o limite de quantificação. Estes resultados indicam que o método cromatográfico é adequado para detectar e quantificar o AF na faixa de concentração entre 10,0 e 70,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A exatidão foi avaliada usando um método de recuperação e mostrou valores de porcentagem de recuperação variando entre 99 e 101% (Tabela 7) para os três níveis de concentração avaliados, o que caracteriza o método como exato, segundo preceitos do ICH (1996) e da ANVISA (2003).

TABELA 7 – VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE EXATIDÃO*

Nível de concentração	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	DPR** (%)
Baixa	15	15,11 \pm 0,25	100,73	1,65
Média	45	44,91 \pm 0,44	99,80	0,98
Alta	65	64,36 \pm 0,55	99,02	0,85

*n = 3, ** DPR = desvio padrão relativo

Os resultados de repetibilidade e de precisão intermediária, expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR), estão apresentados na Tabela 8. Para ambos os estudos, os valores de DPR foram inferiores a 5%, demonstrando a repetibilidade e a precisão intermediária do método analítico empregado (ANVISA, 2003).

A avaliação da robustez do método analítico foi baseada nos valores de DPR obtidos a partir da alteração dos parâmetros de análise, tais como a temperatura da coluna analítica (30 e 40 °C), o fluxo isocrático (0,9 e 1,1 mL.min⁻¹) e o pH da fase móvel (4,0 e 6,0). Com relação a estes parâmetros, os valores de DPR foram inferiores a 2,24%, o que caracteriza o método como robusto conforme resumido na Tabela 9.

TABELA 8 – VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Solução-amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração medida \pm DP* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 9)		
15	16,82 \pm 0,24	1,43
40	40,21 \pm 0,31	0,77
65	64,67 \pm 0,30	0,46
Precisão Intermediária (n = 3)		
Dia 2		
40	39,44 \pm 0,05	0,13
Dia 3		
40	40,32 \pm 0,78	1,93

*DP = desvio padrão; **DPR = desvio padrão relativo

TABELA 9 – VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE ROBUSTEZ (n = 3)

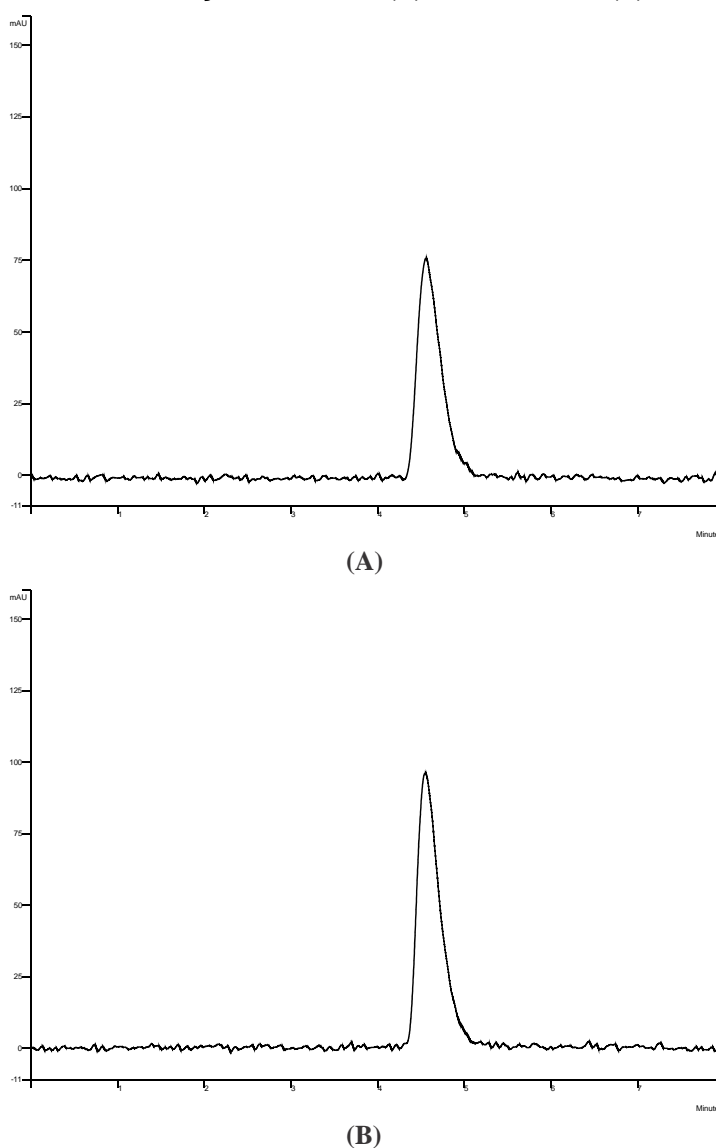
Parâmetro	Conteúdo de fármaco (%) \pm DP*	DPR**	Tempo de retenção (min)
Fluxo (mL.min^{-1})	0,9	102,71 \pm 1,93	1,88
	1,0	100,12 \pm 0,60	0,60
	1,1	99,78 \pm 0,57	0,57
	3,0	100,12 \pm 0,60	0,60
pH da fase móvel	4,0	97,56 \pm 0,98	1,00
	6,0	98,03 \pm 0,37	0,38
	ambiente	100,12 \pm 0,60	0,60
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	100,09 \pm 1,09	1,09
	40	99,14 \pm 2,22	2,24
			4,44

*DP = desvio padrão; **DPR = desvio padrão relativo

5.1.3.3 Estudo de degradação forçada

Quanto à presença de produtos de degradação, estudo de degradação forçada apresentaram resultados diferentes, dependendo da condição de estresse utilizado. Após a exposição ao meio ácido, aproximadamente 29,37% do AF foi degradado (Figura 14,A) e o pico do fármaco foi detectado em 4,56 min. Em condições alcalinas, uma degradação de 16,33% do AF foi observada e o pico do fármaco detectado em 4,55 min (Figura 14,B). Nenhum trabalho anterior investigou a degradação do AF usando HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS OBTIDO APÓS UMA HORA DE EXPOSIÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO SOB CONDIÇÕES ÁCIDAS (A) E ALCALINAS (B)



FONTE: O autor (2016).

Sob condições fotolíticas, as diminuições na concentração de AF a partir de uma solução de metanol foram observados (Figura 15). Por outro lado, a cubeta coberta por papel de alumínio não demonstrou nenhuma degradação após o período de 6 h, o que indica que não houve degradação térmica durante o processo de fotodegradação. Além disso, nenhum pico adicional foi verificado nos cromatogramas do estudo de degradação forçada demonstrando que os produtos de degradação não foram detectados usando as condições cromatográficas propostas nesta metodologia.

Com o intuito de elucidar a cinética de fotodegradação do AF a partir de uma solução metanólica, os dados experimentais foram ajustados a equações de ordem zero, primeira e segunda ordem. Estes gráficos (Figura 15) indicam que processo de fotodegradação do AF em solução metanólica, foi regido por uma cinética de segunda ordem com uma constante de velocidade de $6,27 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1} \times \text{h}$. Neste caso, a degradação do AF é dependente da concentração de fármaco.

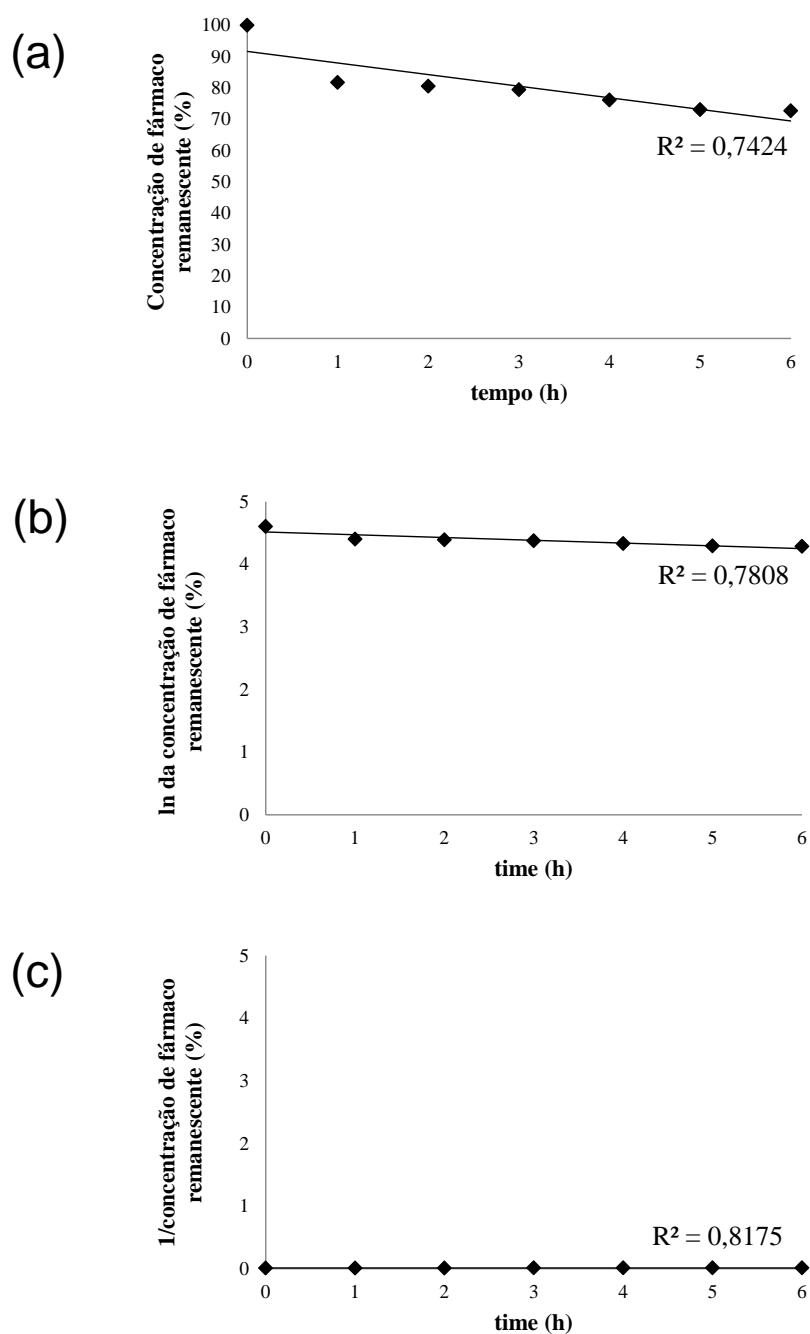
5.1.3.4 Eficiência de encapsulação

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg.g^{-1}) e a eficiência de encapsulação (%) para o sistema S1 foram realizadas pelo método de CLAE previamente validado e estão resumidas na Tabela 10. Todas as formulações preparadas pelo método da emulsão/evaporação do solvente orgânico apresentaram valores adequados de EE, superiores a 98%.

Estes valores podem ser justificados, principalmente, devido à baixa solubilidade aquosa ($6,63 \text{ mg.dL}^{-1}$, a $\text{pH} = 7,2$) do AF (SAIJA et al., 2000) que acarretou em um aumento da concentração de fármaco no interior da micropartícula. Estes resultados são semelhantes ou melhores do que os anteriormente relatados na literatura. Nanopartículas lípicas sólidas de ácido esteárico- e estearil ferulato contendo *E*-AF revelaram uma EE de 95,4 e 97,7%, respectivamente (TROMBINO et al., 2013). Nanopartículas de poli-D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) (M_w 40,000-75,000 g.mol^{-1}) contendo AF apresentaram uma EE de 76% (MERLIN et al., 2012). Uma incorporação superior a 60% foi obtida para o complexo de inclusão AF e hidroxipropil- β -ciclodextrina preparado pelo método de liofilização (WANG et al., 2011).

Portanto, o método validado foi aplicado com sucesso para a determinação do AF em micropartículas poliméricas e pode ser considerado uma ferramenta importante para o controle de qualidade destas formulações.

FIGURA 15 – AJUSTE GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES REMANESCENTES DE ÁCIDO FERÚLICO *VERSUS* TEMPO PARA AS EQUAÇÕES DE ORDEM ZERO (a), PRIMEIRA ORDEM (b), E SEGUNDA ORDEM (c) NO ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

TABELA 10 – TEOR* DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV E DE PCL (mg.g^{-1}) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE, %)

Micropartículas	Ácido ferúlico incorporado (mg.g^{-1})	EE (%)
M1AF5	49,51 \pm 0,21	99,02
M1AF10	100,12 \pm 0,60	100,12
M1AF20	198,65 \pm 0,97	99,32
M2AF5	49,35 \pm 1,76	98,70
M2AF10	98,70 \pm 2,06	98,70
M2AF20	198,20 \pm 2,45	99,10

*média (n = 3) \pm desvio padrão

5.1.4 Análises Morfológicas e de Superfície

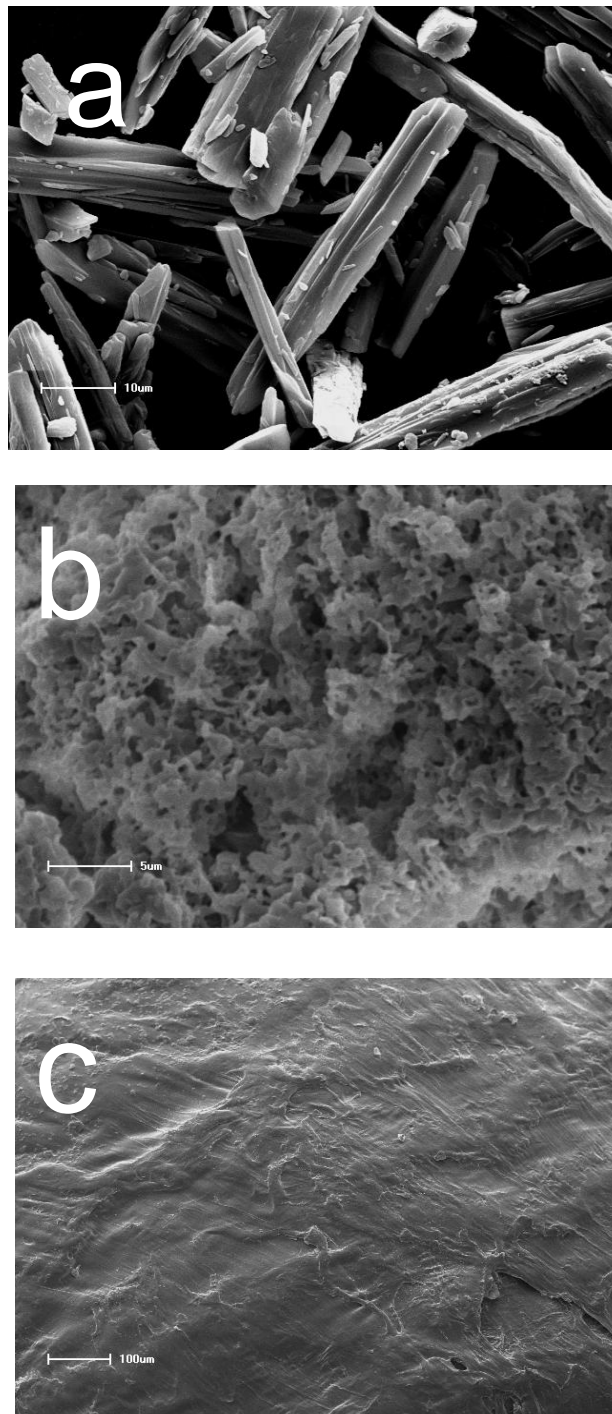
Os resultados obtidos por MEV para o ácido ferúlico e para os polímeros PHBV e PCL estão indicados na Figura 16, sendo que as micrografias foram obtidas em aumento de 1200 vezes. Foi observado que o fármaco (Figura 16,a) apresentou uma morfologia cristalina. O PHBV (Figura 16,b) revelou, antes da preparação das micropartículas, uma forma aglomerada sem estrutura definida. Os péletes de PCL, adquiridos do fornecedor Sigma-Aldrich, apresentaram uma superfície levemente irregular por MEV (Figura 16,c).

A avaliação por MEV das micropartículas do sistema S1M1 demonstrou formato esférico, com superfície rugosa (Figura 17). Os poros foram verificados, inclusive, na superfície das micropartículas M1AF0 (Figura 17,a), elaboradas como controle.

A presença de poros representa uma importante evidência morfológica para essas micropartículas, o que pode modificar o processo de liberação de fármacos. Dados morfológicos similares foram fornecidos por Maia, Santana e Ré (2004), quando micropartículas de PHBV foram preparadas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente. De acordo com a literatura, os poros podem ser decorrentes da natureza do poli-hidroxialcanoato utilizado e/ou resultantes da remoção rápida do solvente orgânico (FARAGO et al., 2008). A rugosidade observada, característica do PHBV puro pode favorecer a degradação do mesmo,

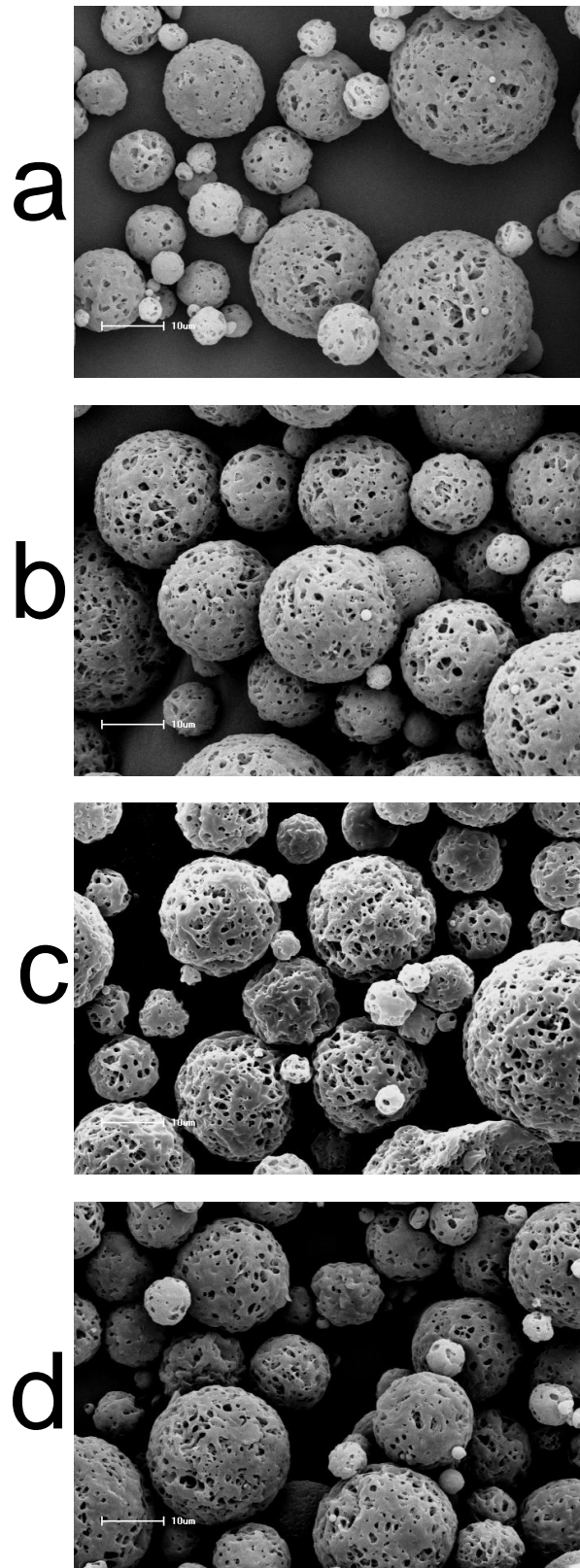
pois proporciona um aumento na área superficial do polímero (MAIA; SANTANA; RÉ, 2004).

FIGURA 16 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÁCIDO FERÚLICO PURO (a), DO PHBV (b) E DA PCL (c) POR MEV, AUMENTO DE 1200 X



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1M1 OBTIDAS POR MEV, AUMENTO DE 1200 X, M1AF0 (a), M1AF5 (b), M1AF10 (c) E M1AF20 (d)

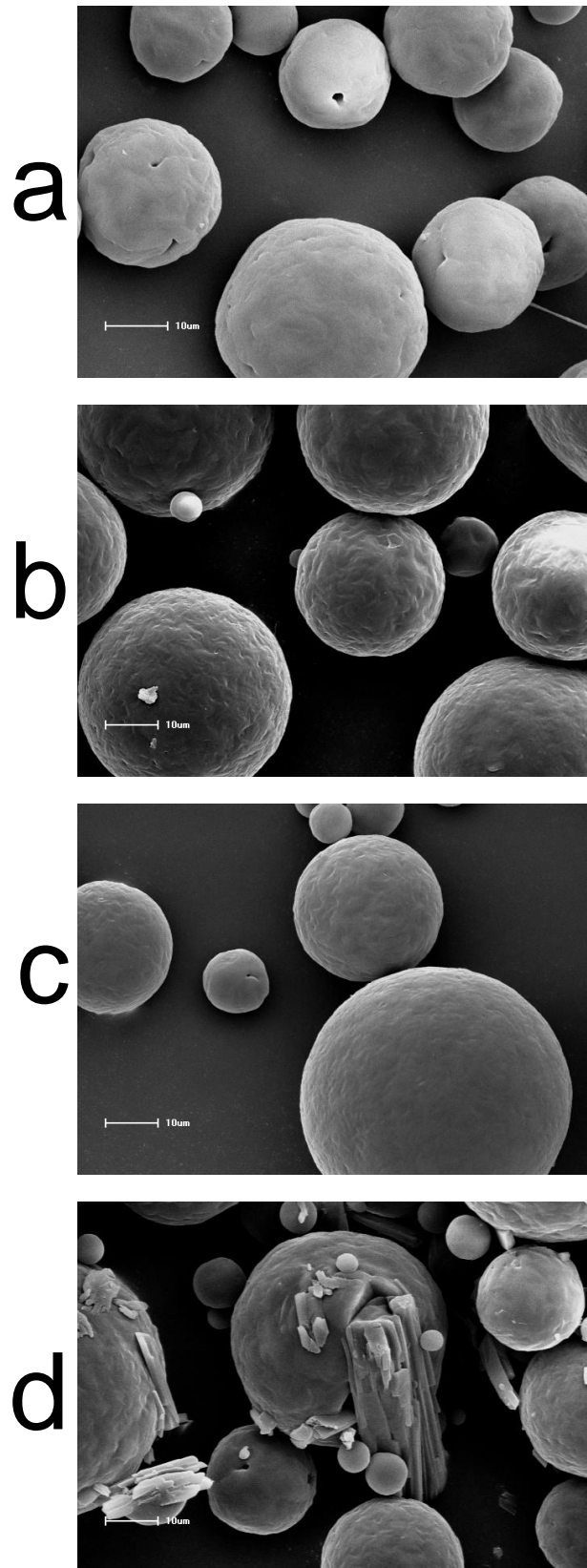


FONTE: O autor (2016).

No entanto, para as micropartículas do sistema S1M2 foi observado um formato esférico, com superfície lisa e regular, sem a presença de poros (Figura 18). Com o aumento da concentração de ácido ferúlico, alguns cristais de fármaco foram verificados na superfície dos materiais, o que pode ser constatado, particularmente, na formulação M2AF20 (Figura 18,d). Essa quantidade de fármaco encontrada na superfície das micropartículas pode ser rapidamente dissolvida no meio aquoso e fornecer um comportamento de liberação imediata (efeito *burst*) (RIEKES et al., 2011). Esse efeito foi também observado em outros estudos relacionados a sistemas de liberação retardada utilizando biopolímeros (DUARTE et al., 2006; STULZER et al., 2008).

A ocorrência de cristais na superfície das micropartículas poliméricas pode ainda estar relacionada à baixa viscosidade da fase orgânica que, em função do volume de solvente empregado (40 mL), pode permitir a migração dos cristais para a interface da gotícula, durante a etapa de extração. Devido à baixa solubilidade do fármaco na fase externa aquosa, os cristais acabam permanecendo na interface até o enrijecimento da micropartícula. Esse fenômeno foi relatado anteriormente em estudos empregando o processo de emulsão/evaporação de solvente por Lionzo (2006), Gibaud, Bonneville, Astier (2002) e Binbaum et al. (2000).

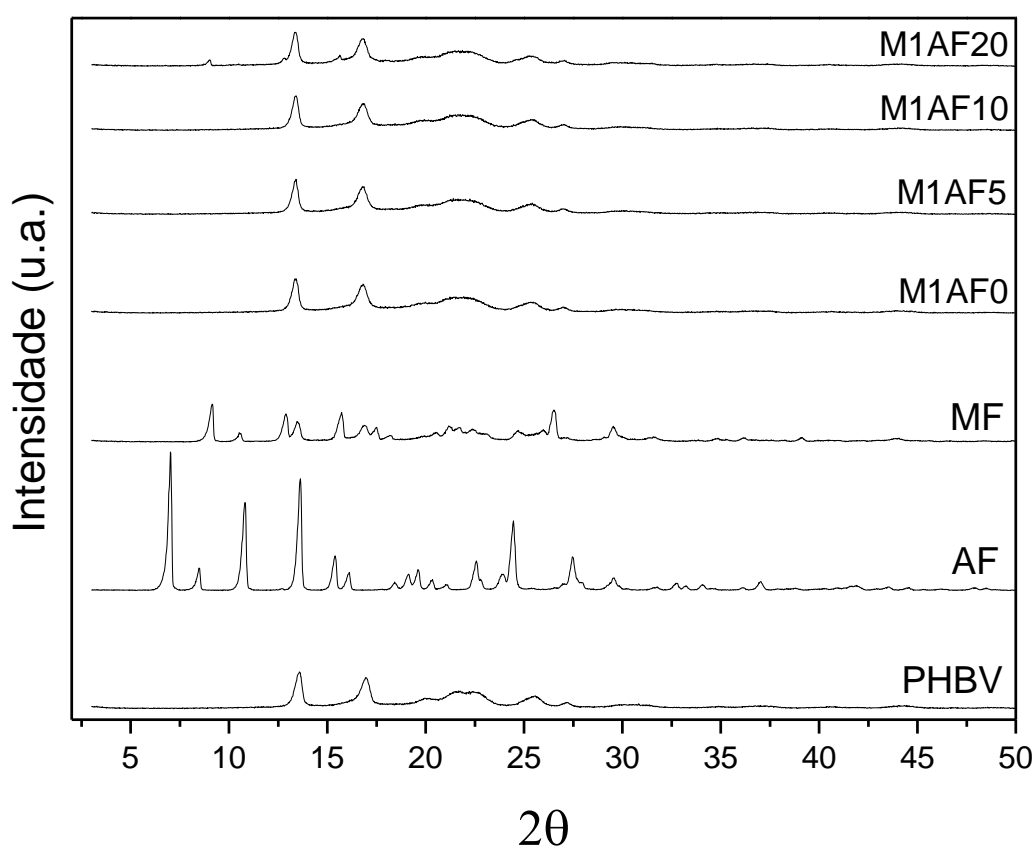
FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1M2 OBTIDAS POR MEV, AUMENTO DE 1200 X, M2AF0 (a), M2AF5 (b), M2AF10 (c) E M2AF20 (d)



FONTE: O autor (2016).

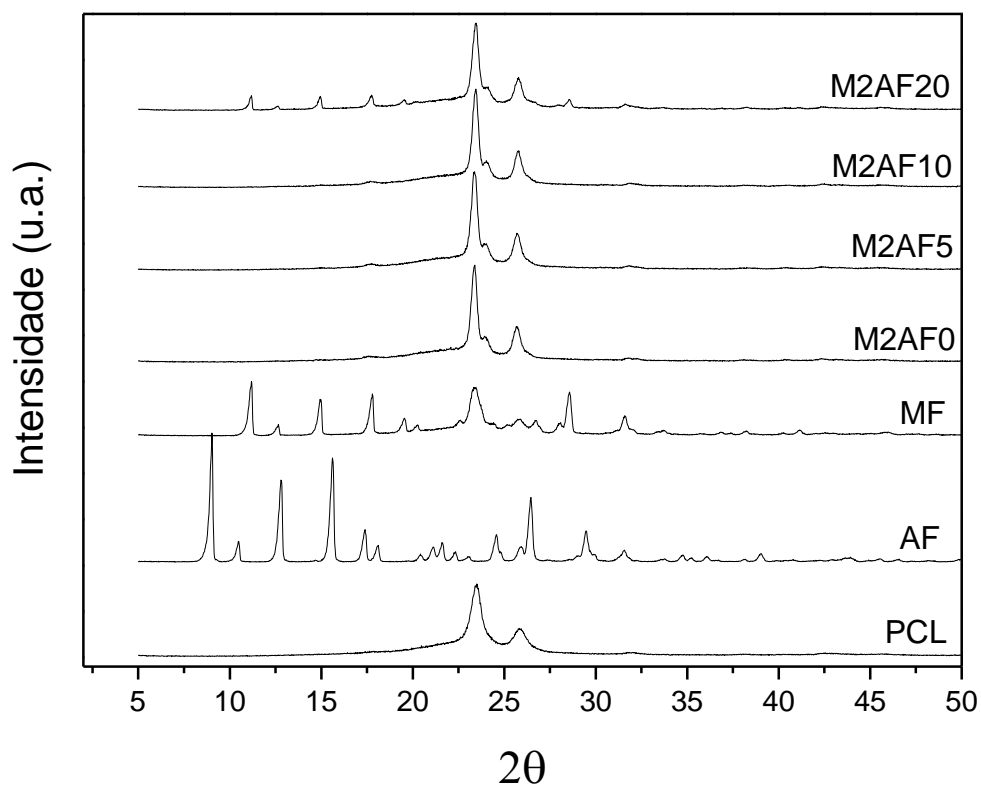
Com relação à análise por difração de raios X (Figuras 19 e 20), foi verificado que os difratogramas das micropartículas, preparadas na presença e na ausência do fármaco, indicaram perfis semelhantes aos obtidos para os polímeros de partida. Para as micropartículas S1M1 (Figura 19) e S1M2 (Figura 20), as intensidades de difração cristalina foram menores do que aquelas observadas para as respectivas misturas físicas, não sendo possível visualizar os picos característicos de cristalinidade do ácido ferúlico. Esses resultados sugerem que o método de microencapsulação foi responsável por reduzir a cristalinidade do fármaco e que o mesmo pode estar em dispersão molecular no interior das micropartículas ou na superfície do material polimérico, apresentando estado amorfo.

FIGURA 19 – DIFRATOGRAMAS DO ÁCIDO FERÚLICO, DO PHBV, DA MISTURA FÍSICA E DAS MICROPARTÍCULAS S1M1



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 20 – DIFRATOGRAMAS DO ÁCIDO FERÚLICO, DA PCL, DA MISTURA FÍSICA E DAS MICROPARTÍCULAS S1M2



FONTE: O autor (2016).

5.1.5 Determinação do Tamanho de Partícula e da Dispersão Granulométrica

Os resultados de diâmetro médio e de *span* para as micropartículas poliméricas do sistema S1 estão apresentados na Tabela 11, sendo que as distribuições granulométricas estão demonstradas nas Figuras 21 e 22.

Para o sistema M1, a análise por espectroscopia de difração a laser indicou a presença de micropartículas poliméricas com diâmetro médio entre 15,40 μm (formulação M1AF10) e 30,05 μm (formulação M1AF5). As micropartículas do sistema M2 mostraram diâmetros médios variando de 38,21 μm (controle negativo) a 50,20 μm (formulação M2AF5). Esses resultados indicam tamanhos de partícula superiores aos observados por MEV, o que pode ser justificado pela leitura de agregados de micropartículas quando da avaliação por espectroscopia de difração a laser.

Todas as formulações preparadas apresentaram valores de diâmetro médio inferiores a 50,20 μm e, embora esse tamanho de partícula não permita uma absorção pelos enterócitos, a administração oral dessas micropartículas pode proporcionar um efeito sustentado do fármaco, devido ao seu tempo prolongado de trânsito intestinal (DESAI et al., 1996).

TABELA 11 – DIÂMETRO MÉDIO E *SPAN*¹ (DISPERSÃO GRANULOMÉTRICA) PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S1 (M1 E M2), INDICANDO O TEOR² DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO EM CADA MATERIAL

Formulação	Ácido ferúlico incorporado (mg.g^{-1})	Diâmetro médio (μm)	<i>Span</i>
M1AF0	—	28,99	1,80
M1AF5	49,51 \pm 0,021	30,05	1,52
M1AF10	98,85 \pm 0,005	15,40	1,62
M1AF20	198,65 \pm 0,097	15,45	1,82
M2AF0	—	38,21	1,21
M2AF5	49,35 \pm 1,76	50,20	0,95
M2AF10	98,70 \pm 2,06	47,59	0,92
M2AF20	198,20 \pm 2,45	45,11	0,96

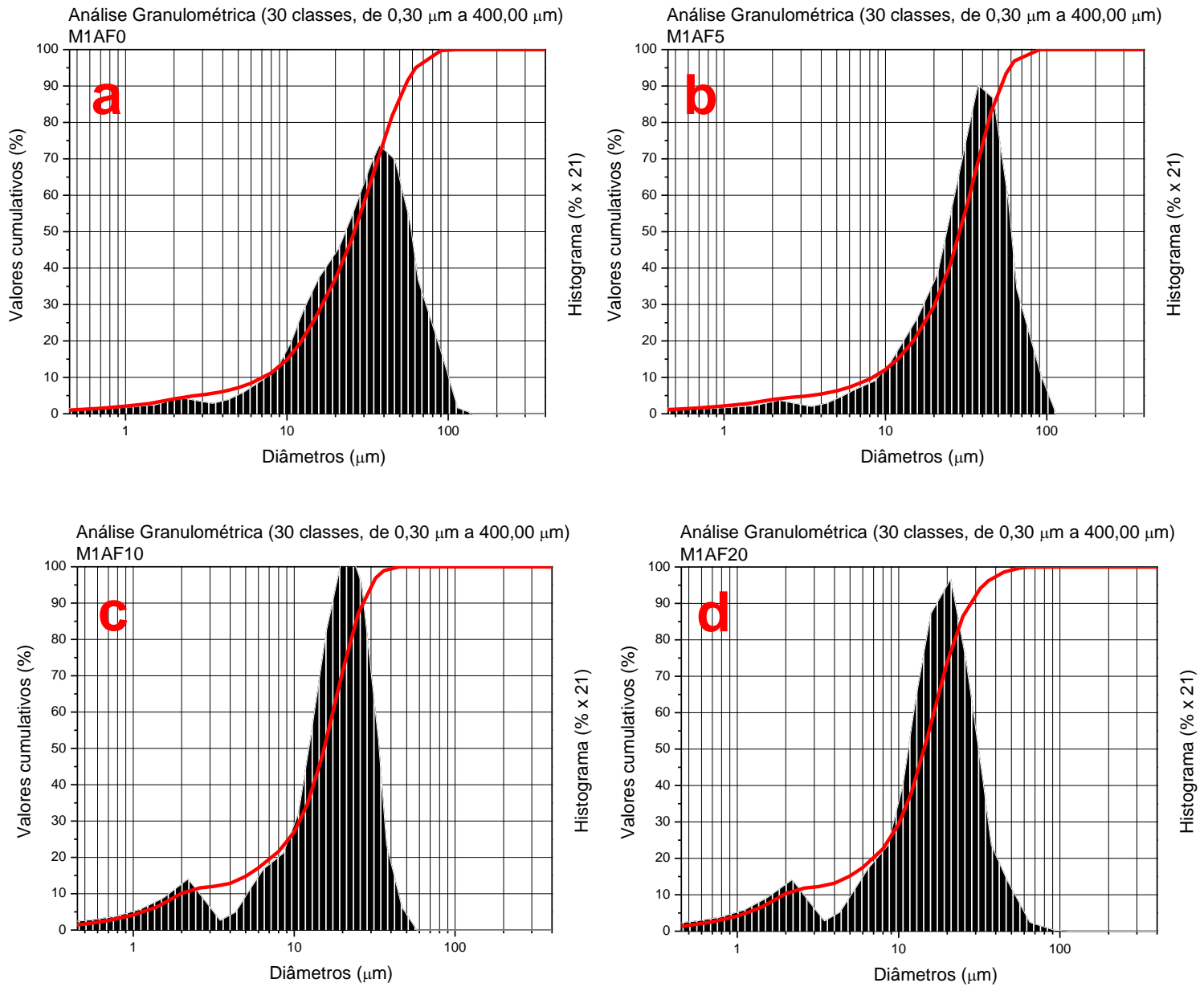
¹ calculado a partir do diâmetro das partículas correspondente a 90%, 10% e 50% da distribuição acumulada para cada amostra

² média ($n = 3$) \pm desvio padrão

Com relação aos valores de *span*, todos os materiais do sistema S1 (micropartículas M1 e M2) revelaram valores inferiores a 2, o que representa uma estreita dispersão em função da proximidade dos dados em torno da média. Dessa forma, as micropartículas formuladas a partir do PHBV e da PCL apresentaram um comportamento monomodal.

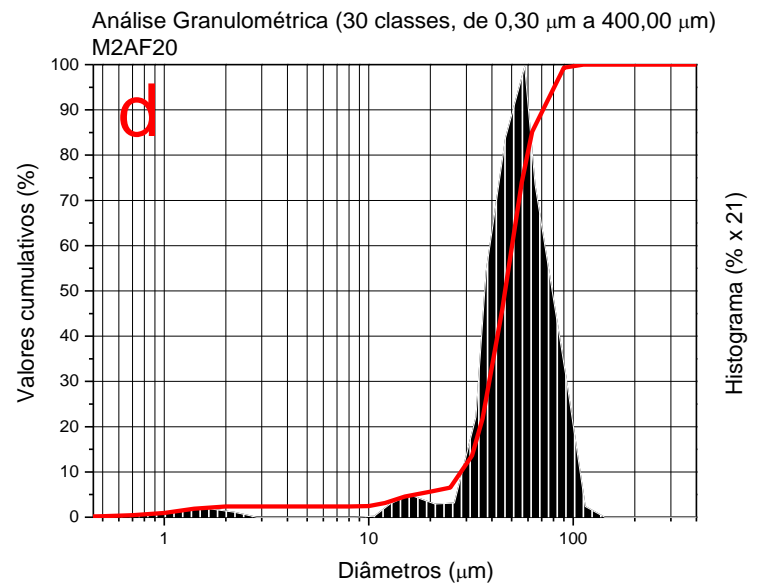
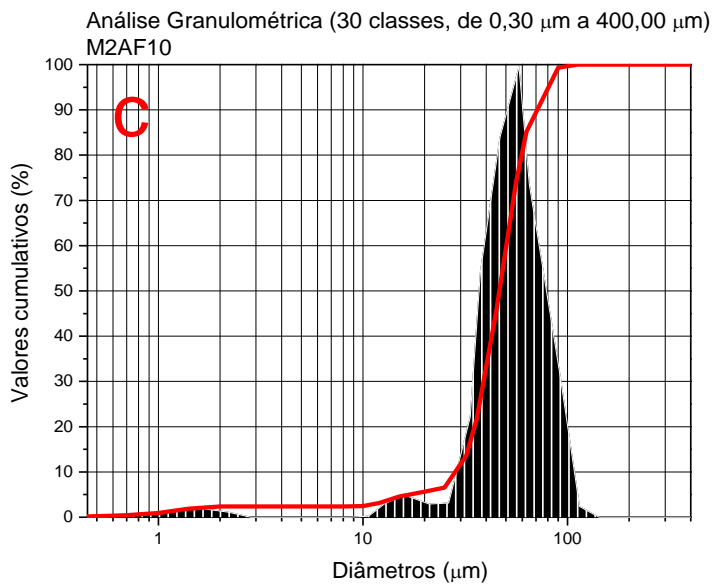
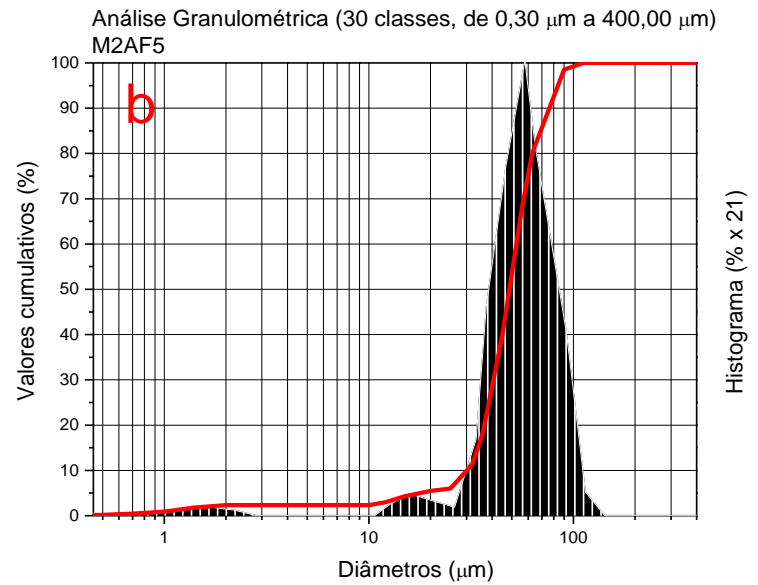
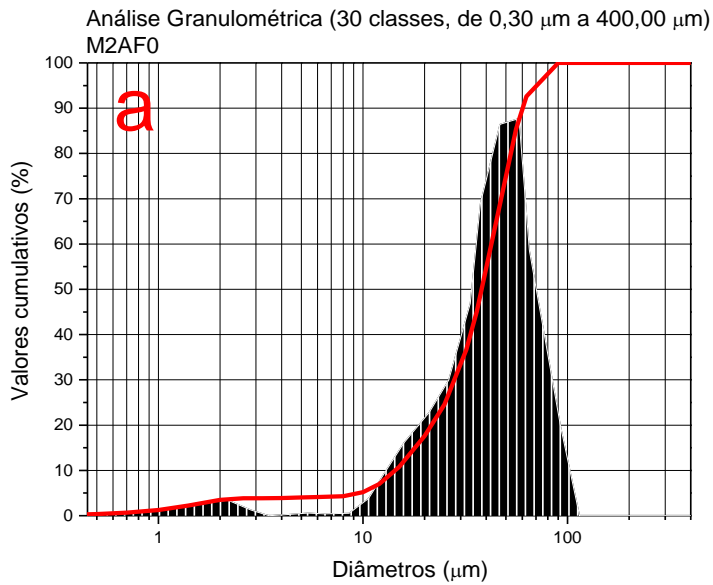
Trombino et al. (2013) obtiveram nanopartículas sólidas lipídicas contendo ácido ferúlico preparadas a partir do estearil ferulato e do ácido esteárico com diâmetros médios de partícula entre 0,5 e 0,6 μm . Esses valores são inferiores aos observados no presente trabalho, o que pode ser atribuído às diferenças entre os métodos de encapsulação empregados.

FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA OBTIDA PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2, M1AF0 (a), M1AF5 (b), M1AF10 (c), M1AF20 (d)



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 22 – DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA OBTIDA PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2, M2AF0 (a), M2AF5 (b), M2AF10 (c), M2AF20 (d)



FONTE: O autor (2016).

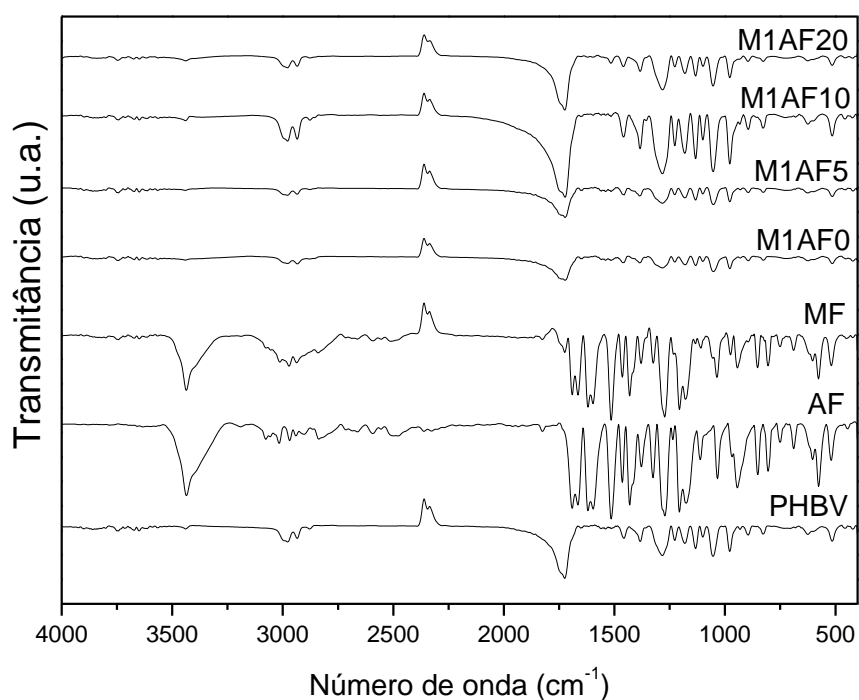
5.1.6 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros de IVTF do sistema S1 (micropartículas M1 e M2) estão mostrados nas Figuras 23 e 24, respectivamente. O espectro do ácido ferúlico puro indicou uma banda típica referente à vibração de deformação axial do grupamento OH em 3437 cm^{-1} . A ocorrência de uma banda em 3016 cm^{-1} no espectro é atribuída ao estiramento assimétrico do grupamento C-H. O evento de uma banda em 1713 cm^{-1} se deve ao estiramento do grupamento carbonila conjugado ao anel aromático e três bandas intensas e características em 1618, 1598 e 1518 cm^{-1} , correspondentes às vibrações de deformação axial do anel aromático. Absorção em 1464 cm^{-1} é indicativo da deformação axial do grupamento C-H do anel aromático. A banda em 1272 cm^{-1} é atribuída à deformação axial do grupamento C-O-C. Ainda, as bandas nítidas em 804 e 832 cm^{-1} são devidas a dois átomos de hidrogênio adjacentes no anel fenil (SAJJADI et al., 2012; WANG et al., 2011).

O espectro infravermelho do PHBV exibiu uma banda forte em 1720 cm^{-1} devido ao estiramento do grupamento C=O. Bandas típicas de $800\text{-}975\text{ cm}^{-1}$ foram correspondentes à vibração de estiramento simétrico de -C-O-C- . Além disso, o estiramento antisimétrico de -C-O-C- conduziu a formação de bandas entre $1060\text{ e }1150\text{ cm}^{-1}$ (MAGHSOODI, 2009). Considerando que a PCL também é um poliéster alifático, seu espectro foi semelhante ao do PHBV com uma banda forte em 1727 cm^{-1} , correspondente a vibração de deformação axial do grupamento C=O e duas bandas em 2943 e 2864 cm^{-1} , devido as vibrações simétricas e assimétricas do grupamento -CH_2 , respectivamente (POLETTTO et al., 2007).

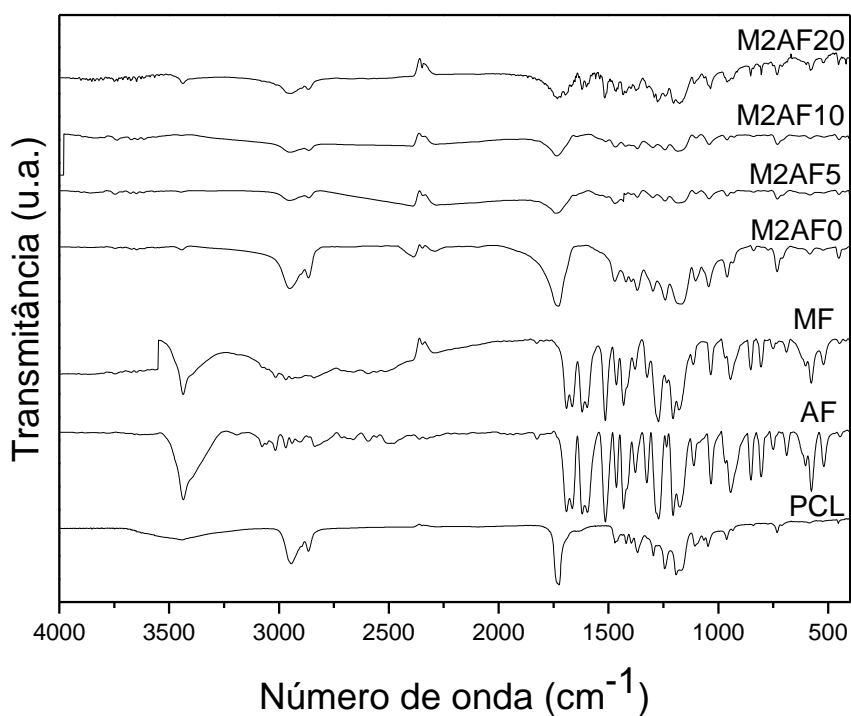
Os espectros obtidos para as micropartículas de PHBV e de PCL apresentaram bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para as respectivas misturas físicas. Portanto, é possível estabelecer que nenhuma ligação química entre o fármaco e os polímeros foi formada durante o processo de microencapsulação.

FIGURA 23 – ESPECTROS IVTF DO PHBV, ÁCIDO FERÚLICO (AF), DA MISTURA FÍSICA (MF) E DAS MICROPARTÍCULAS M1AF0, M1AF5, M1AF10 E M1AF20



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 24 – ESPECTROS IVTF DA PCL, ÁCIDO FERÚLICO (AF), DA MISTURA FÍSICA (MF) E DAS MICROPARTÍCULAS M2AF0, M2AF5, M2AF10 E M2AF20



FONTE: O autor (2016).

5.2 SISTEMA S2: MICROPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO, PREPARADAS PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO, A PARTIR DO POLÍMERO (MET)ACRÍLICO EUDRAGIT® L100

As micropartículas de Eudragit® L100 que compõem o sistema S2 (M3AF0, M3AF5, M3AF10 e M3AF20) foram obtidas com sucesso pelo método de secagem por aspersão. Após a secagem, os materiais do sistema S2 apresentaram um aspecto macroscópico pulverulento de cor branca, semelhante à observada para o Eudragit® L100 puro.

5.2.1 Rendimento

Os rendimentos foram calculados com base na Equação 2 para as micropartículas do sistema S2. A Tabela 12 sumariza os resultados percentuais, apresentados na forma de valor médio e desvio padrão.

Todas as formulações revelaram um rendimento superior a 65%, o que pode ser considerado aceitável a partir do método empregado. As micropartículas elaboradas com a menor quantidade de fármaco (5% de ácido ferúlico) apresentaram o menor valor de rendimento, sendo 65,4% para a formulação M3AF5, 67,9% para a M3AF10 e 67,9% para a formulação M3AF20.

TABELA 12 – RENDIMENTO* OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES DO SISTEMA S2, A PARTIR DO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO

Formulação	Ácido ferúlico inicial (g)	Rendimento (%)
M3AF0	—	75,8 ± 9,3
M3AF5	0,100	65,4 ± 8,2
M3AF10	0,200	67,9 ± 4,5
M3AF20	0,400	67,9 ± 5,9

* média (n = 3) ± desvio padrão

O processo de secagem por aspersão pode fornecer baixos valores de rendimento que podem ser justificados pela adsorção do pó na torre de secagem, processo observado visivelmente, ou ainda, devido às perdas de fármaco não encapsulado com o fluxo do ar de secagem, através da abertura superior do ciclone

(RATTES & OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006; SOUZA & OLIVEIRA, 2006).

5.2.2 Determinação do Teor de Umidade

A Tabela 13 fornece os resultados referentes ao teor de água presente nas micropartículas que integram o sistema S2, frente aos valores obtidos para o ácido ferúlico (1,47%) e Eudragit® L100 (1,62%).

As micropartículas do sistema S2 apresentaram um teor de umidade semelhante ao do fármaco e do polímero puro, variando entre 1,40% e 1,58%, respectivamente para as formulações M3AF5 e M3AF0. Esses resultados indicam que o processo de secagem por aspersão foi efetivo na remoção da mistura água-etanol (50:50 v/v) empregada como solvente no processo de microencapsulação.

O conteúdo de umidade das partículas submetidas ao processo de secagem por aspersão é um importante indicativo da eficiência de secagem e da qualidade dos produtos obtidos. As propriedades de fluxo, a compressibilidade, a tendência à aglomeração e a estabilidade dos materiais são altamente dependentes dos teores de água (RATTES & OLIVEIRA, 2007; BOSQUILLON et al., 2004). Nesse sentido, um baixo teor de água, semelhante ao das matérias-primas, garante uma qualidade adequada para a utilização proposta.

TABELA 13 – TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ÁCIDO FERÚLICO, PARA O EUDRAGIT® L100 E PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2

Material	Umidade (%)
Ácido ferúlico	1,47 ± 0,12
Eudragit® L100	1,62 ± 0,15
M3AF0	1,58 ± 0,12
M3AF5	1,40 ± 0,09
M3AF10	1,43 ± 0,10
M3AF20	1,52 ± 0,08

* média (n = 3) ± desvio padrão

5.2.3 Determinação do Ácido Ferúlico Incorporado nas Micropartículas e Eficiência de Encapsulação (EE)

O teor de fármaco (mg.g^{-1}) e a eficiência de encapsulação (%) para micropartículas estão resumidos na Tabela 14. Valores elevados de EE foram obtidos para as micropartículas de Eudragit® L100 preparadas por secagem por aspersão a partir do método analítico de CLAE previamente validado. Todas as formulações apresentaram valores adequados de EE, próximos a 100%.

TABELA 14 – TEOR¹ DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT® L100 (mg.g^{-1}) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO² (EE, %)

Material	AF incorporado (mg.g^{-1})	EE (%)
M3AF0	—	—
M3AF5	$102,08 \pm 1,78$	102,08
M3AF10	$204,42 \pm 2,46$	102,21
M3AF20	$404,10 \pm 2,32$	100,82

¹média (n = 3) \pm desvio padrão

²média (n = 3)

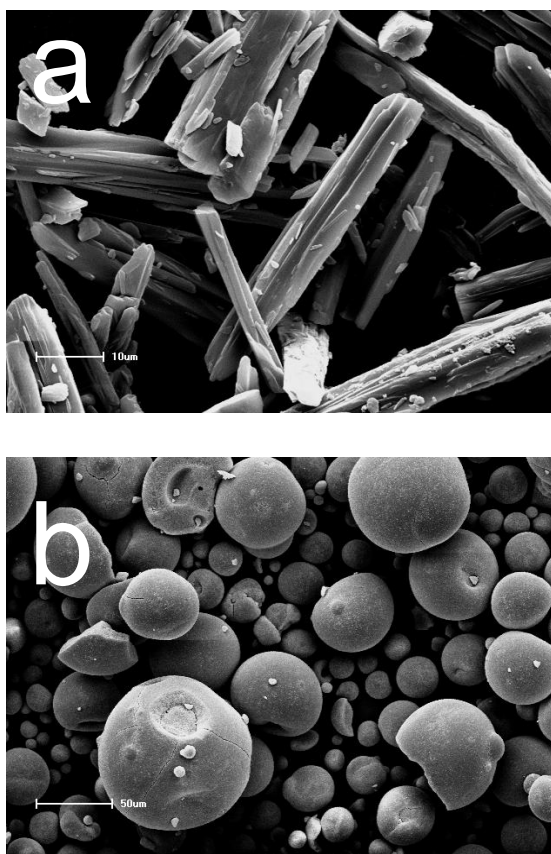
Resultados semelhantes ou inferiores foram previamente relatados para materiais nanoparticulados contendo este fármaco. Nanopartículas de poli-D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) (M_w 40,000-75,000 g.mol^{-1}) contendo AF apresentaram uma EE de 76% (MERLIN et al., 2012). Nanopartículas lípicas sólidas de ácido esteárico- e estearil ferulato contendo AF revelaram uma EE de 95,4 e 97,7%, respectivamente (TROMBINO et al., 2013). Estas diferenças estão basicamente relacionadas com o processo de microencapsulação realizado. Este trabalho é o primeiro a relatar a utilização do método de secagem por aspersão para a obtenção de micropartículas poliméricas contendo AF. Durante este processo de secagem, a evaporação do solvente é rápida e o aprisionamento do fármaco ocorre quase que instantaneamente (GHARSALLAOUI et al., 2007). Se não ocorrer separação de fases ou segregação do fármaco ou do polímero durante a secagem, uma elevada eficiência de encapsulação pode ser obtida. Além disso, é um

procedimento de única etapa, de baixo custo, e de fácil transposição de escala (RIZI et al., 2011) e que não envolve solventes orgânicos de elevada toxicidade para microencapsulação, quando comparado, por exemplo, ao método de emulsão evaporação do solvente (óleo em água ou óleo em óleo). Assim, a secagem por aspersão proporciona valores elevados de EE e inúmeras vantagens em relação à microtecnologia farmacêutica.

5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os resultados obtidos por MEV para o ácido ferúlico e para o polímero de partida estão indicados na Figura 25, sendo que as micrografias foram obtidas em aumento de 500 vezes. Foi observado que o fármaco (Figura 25,a) apresentou uma morfologia cristalina. O Eudragit® L100 (Figura 25,b) revelou, antes da preparação das micropartículas, uma geometria esférica e superfície lisa.

FIGURA 25 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÁCIDO FERÚLICO PURO (a) (AUMENTO DE 1200 X) E DO EUDRAGIT® L100 (b) (AUMENTO DE 270 X) POR MEV



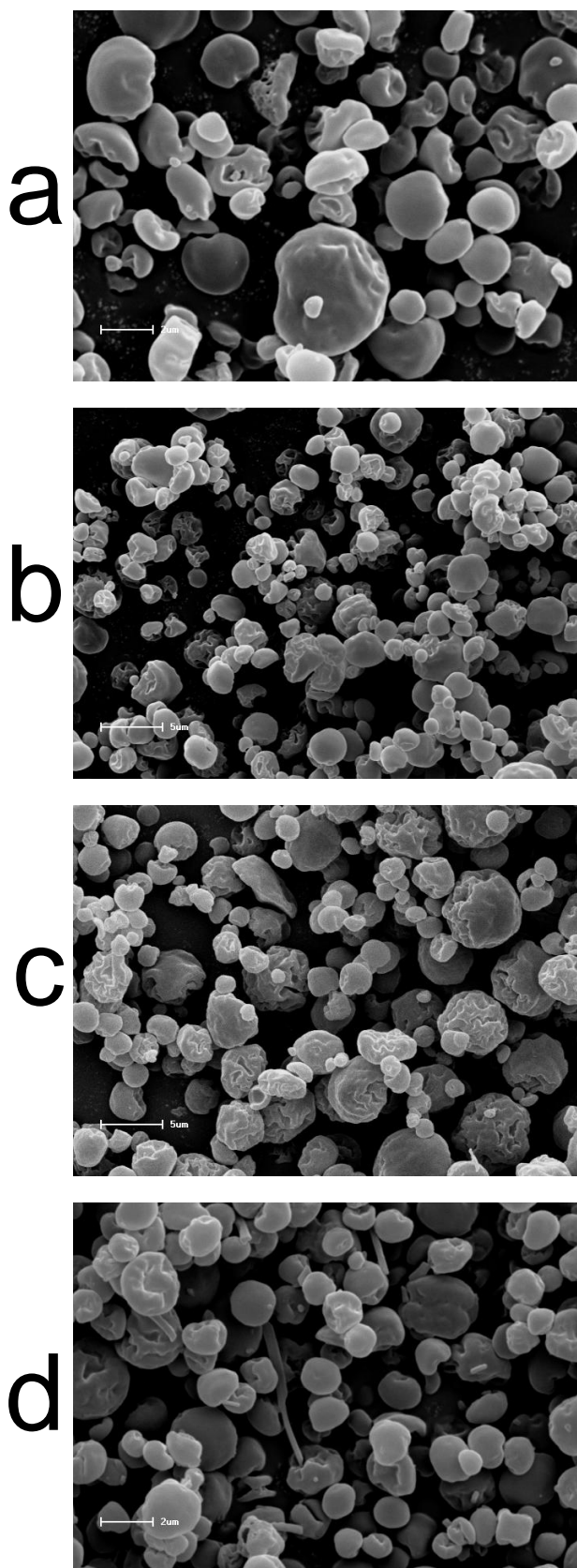
FONTE: O autor (2016).

A avaliação por MEV das micropartículas do sistema S2 (Figura 26, a-d) demonstrou formato esférico ou quase esférico, com superfície lisa.

As micropartículas preparadas por secagem por aspersão (M3AF0, M3AF5, M3AF10 e M3AF20) apresentarem-se, de maneira geral, com formatos esféricos, com superfícies lisas e/ou levemente irregulares, sem a presença de poros, e com algumas deformações e concavidades características. Na formulação M3AF20 foram verificados alguns cristais de fármaco na superfície dos materiais (Figura 26,d).

As deformações observadas estão relacionadas à estrutura oca das micropartículas que tornaram-as colabadas e enrugadas. Este comportamento é característico dos processos de secagem por aspersão (RAO et al., 2013; RIZI et al., 2011; ESPOSITO et al., 2000), especialmente considerando a matéria-prima que foi utilizada. Se o material particulado é oco, após a secagem ele apresenta a tendência a encolher e a deformar (FARAGO et al., 2008).

FIGURA 26 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2 OBTIDAS POR MEV, AUMENTO DE 2400 X, M3AF0 (a), M3AF5 (b), M3AF10 (c) E M3AF20 (d)



FONTE: O autor (2016).

5.2.5 Determinação do Tamanho de Partícula e da Dispersão Granulométrica

Os resultados de diâmetro médio e de *span* para as micropartículas de Eudragit® L100 do sistema S2 estão apresentados na Tabela 15.

Todas as formulações preparadas apresentaram valores de diâmetro médio entre 2 e 3 μm . O tamanho micrométrico dessas micropartículas pode proporcionar um efeito sustentado do fármaco quando administrado por via oral, devido ao seu tempo prolongado de trânsito intestinal (BARBOZA et al., 2014; DESAI et al., 1996).

Com relação aos valores de *span*, todas as formulações do sistema S2 revelaram valores inferiores a 2, o que representa uma estreita dispersão em função da proximidade dos dados em torno da média (FARAGO et al., 2008). Dessa forma, as micropartículas formuladas a partir do Eudragit® L100 apresentaram um comportamento monomodal adequado.

TABELA 15 – TEOR DE ÁGUA¹, TEOR DE ÁCIDO FERÚLICO INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS¹, EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)², DIÂMETRO MÉDIO¹, E *SPAN* PARA AS MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT® L100 DO SISTEMA S2

Material	Teor de água (%)	AF incorporado (mg.g ⁻¹)	EE (%)	Diâmetro médio (μm)	<i>Span</i>
M3AF0	1,58 \pm 0,12	—	—	2,46 \pm 0,99	1,44
M3AF5	1,40 \pm 0,09	102,08 \pm 1,78	102,08	2,48 \pm 1,29	1,53
M3AF10	1,43 \pm 0,10	204,42 \pm 2,45	102,21	2,61 \pm 1,16	1,32
M3AF20	1,52 \pm 0,08	404,10 \pm 2,32	100,82	2,54 \pm 0,99	1,33

¹média (n = 3) \pm desvio padrão

²média (n = 3)

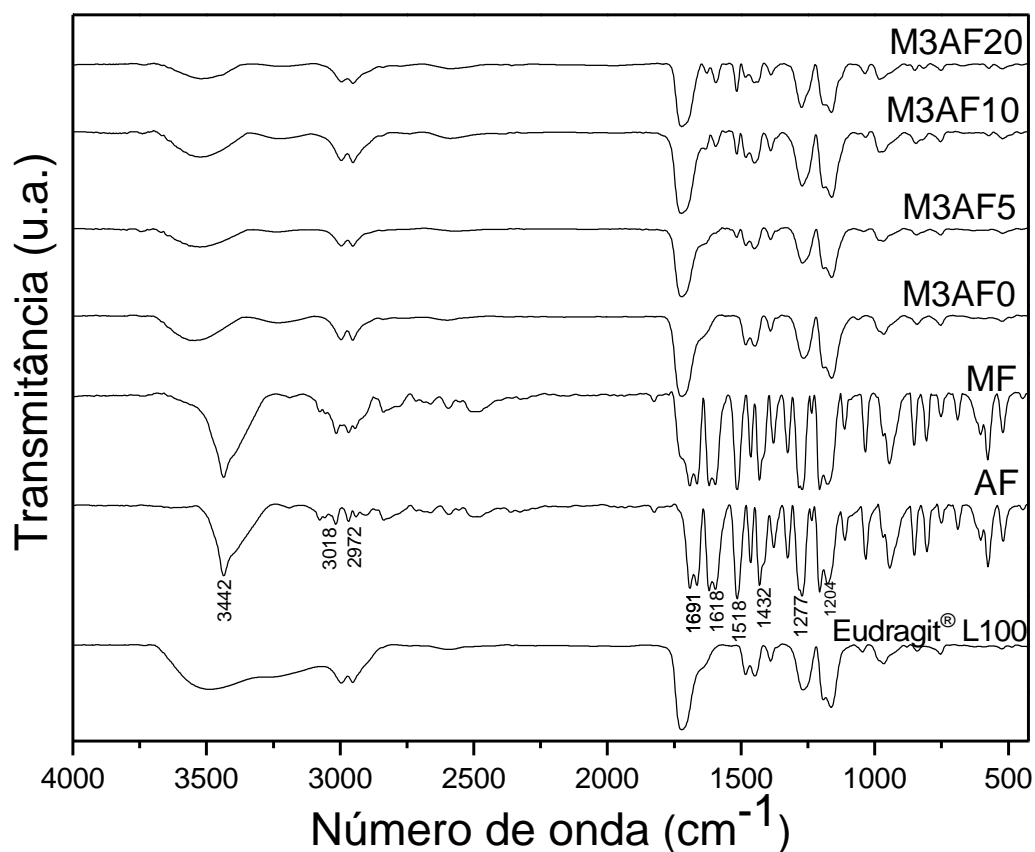
5.2.6 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros de IVTF do sistema S2 (AF, Eudragit[®] L100, mistura física e micropartículas) estão mostrados na Figura 27. O espectro de IVTF do ácido ferúlico puro indicou bandas de absorção referentes à vibração de deformação axial do grupamento OH (3442 cm^{-1}), vibrações de estiramento de C-H aromático e de alceno (3018 cm^{-1}), vibrações de estiramento de C-H de alcano (2972 cm^{-1}), vibração de estiramento de C=O conjugado ao anel aromático (1691 cm^{-1}), vibração de estiramento de C=C aromático ($1618, 1595, 1518, 1432\text{ cm}^{-1}$), vibração de estiramento assimétrico de C-O-C (1277 cm^{-1}) e vibração de estiramento de C-OH (1204 cm^{-1}).

O espectro de IVTF do Eudragit[®] L100 apresentou uma banda alargada decorrente da vibração de estiramento de OH ($3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), uma banda relacionada à vibração de estiramento de C-H alifático ($3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$) e uma banda de vibração de estiramento de C=O do grupo éster e de ácido carboxílico ($1740\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$).

As bandas de absorção atribuídas à mistura física corresponderam simplesmente à sobreposição dos espectros de IVTF do AF puro e do Eudragit[®] L100. Em geral, os espectros IVTF das micropartículas de Eudragit[®] L100 contendo o AF mostraram as bandas de absorção típicas das matérias-primas, principalmente do Eudragit[®] L100 (Figura 27). No entanto, os espectros de IVTF dessas formulações também demonstraram alterações e ampliação da banda de OH e mudança no número de onda do grupo C=O em comparação com a mistura física. Esse resultado sugere que uma interação intermolecular do tipo ligação de hidrogênio ($\text{O-H}\cdots\text{O=C}$) foi formada entre o AF e o Eudragit[®] L100 após o procedimento de secagem por aspersão. Sahoo et al. (2012) observaram previamente que ligações de hidrogênio tem uma influência significativa na forma e intensidade das bandas, geralmente causando ampliação nas bandas e mudanças, o que foi semelhante aos nossos resultados e pode conduzir a uma liberação controlada do fármaco.

FIGURA 27 – ESPECTROS IVTF DO AF, DO POLÍMERO DE PARTIDA EUDRAGIT® L100, DA MISTURA FÍSICA (MF) (AF:EUDRAGIT® L100, 1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS M3AF0, M3AF5, M3AF10 E M3AF20 QUE INTEGRAM O SISTEMA S2



FONTE: O autor (2016).

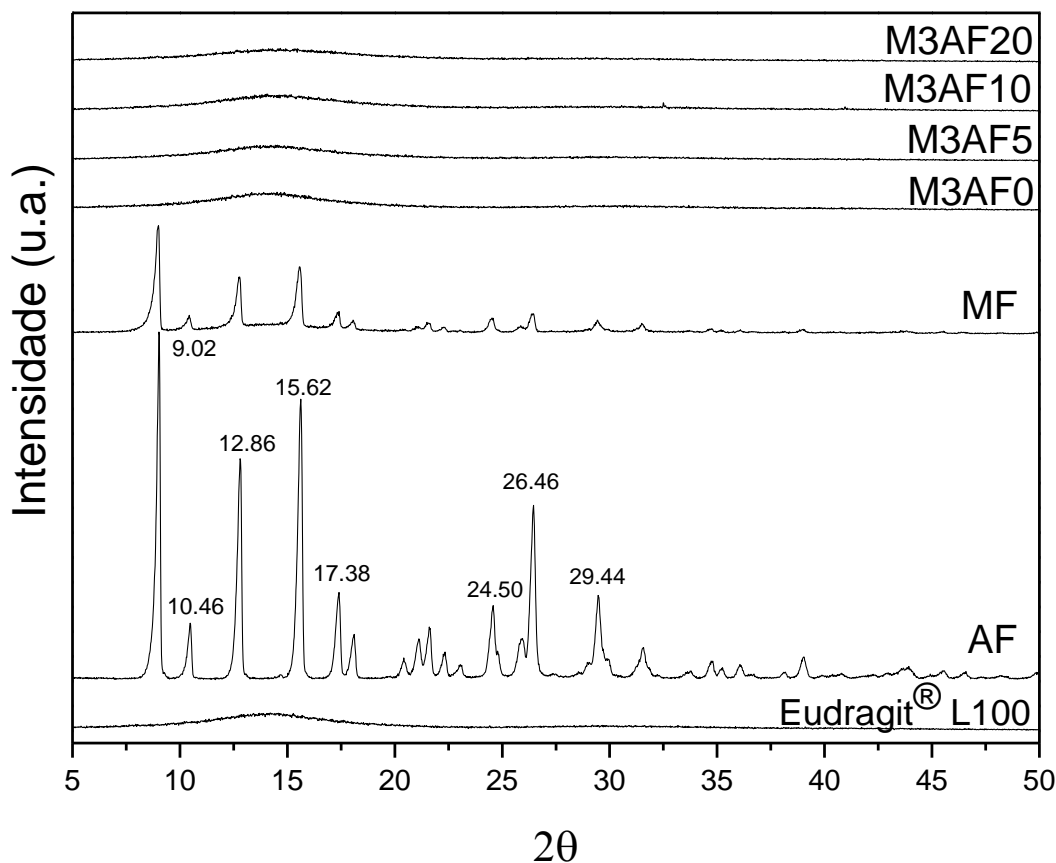
5.2.7 Difração de Raios X

A Figura 28 sumariza os resultados obtidos por difração de raios X para o ácido ferúlico puro, para o Eudragit® L100, para a mistura física e para as micropartículas do sistema S2. No caso do fármaco puro, foram verificados diferentes picos relacionados com a sua estrutura cristalina, sendo que os picos principais aparecem em $2\theta = 9,02, 12,86, 15,62,$ e $26,46^\circ$, enquanto que o Eudragit® L100 apresentou um padrão de difração não-cristalino. Uma redução nos picos de cristalinidade típicos do AF foi observada na mistura física. As micropartículas do sistema S2 demonstraram perfis de difração cristalina muito semelhante ao Eudragit® L100 puro, não sendo observados os picos de cristalinidade característicos do AF.

Com relação à análise por difração de raios X, os difratogramas das micropartículas sugerem que o processo de microencapsulação promoveu uma diminuição notável dos picos de difração cristalina característicos do ácido ferúlico, levando à amorfização do fármaco.

Substâncias no estado sólido podem revelar características cristalinas e/ou amorfas. Em geral, os sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas, devido às energias livres envolvidas no processo de dissolução. Sólidos no estado amorfo têm moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, pouca energia é necessária para separá-los. Consequentemente, a sua dissolução é mais rápida do que quando na forma cristalina (STULZER et al., 2009). Tendo em vista que, o AF é um fármaco de baixa solubilidade aquosa, este comportamento pode acarretar em um melhor desempenho no seu perfil de dissolução.

FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DO AF, DO POLÍMERO DE PARTIDA EUDRAGIT® L100, DA MISTURA FÍSICA (MF) (AF: EUDRAGIT® L100, 1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS M3AF0, M3AF5, M3AF10 E M3AF20 QUE INTEGRAM O SISTEMA S2



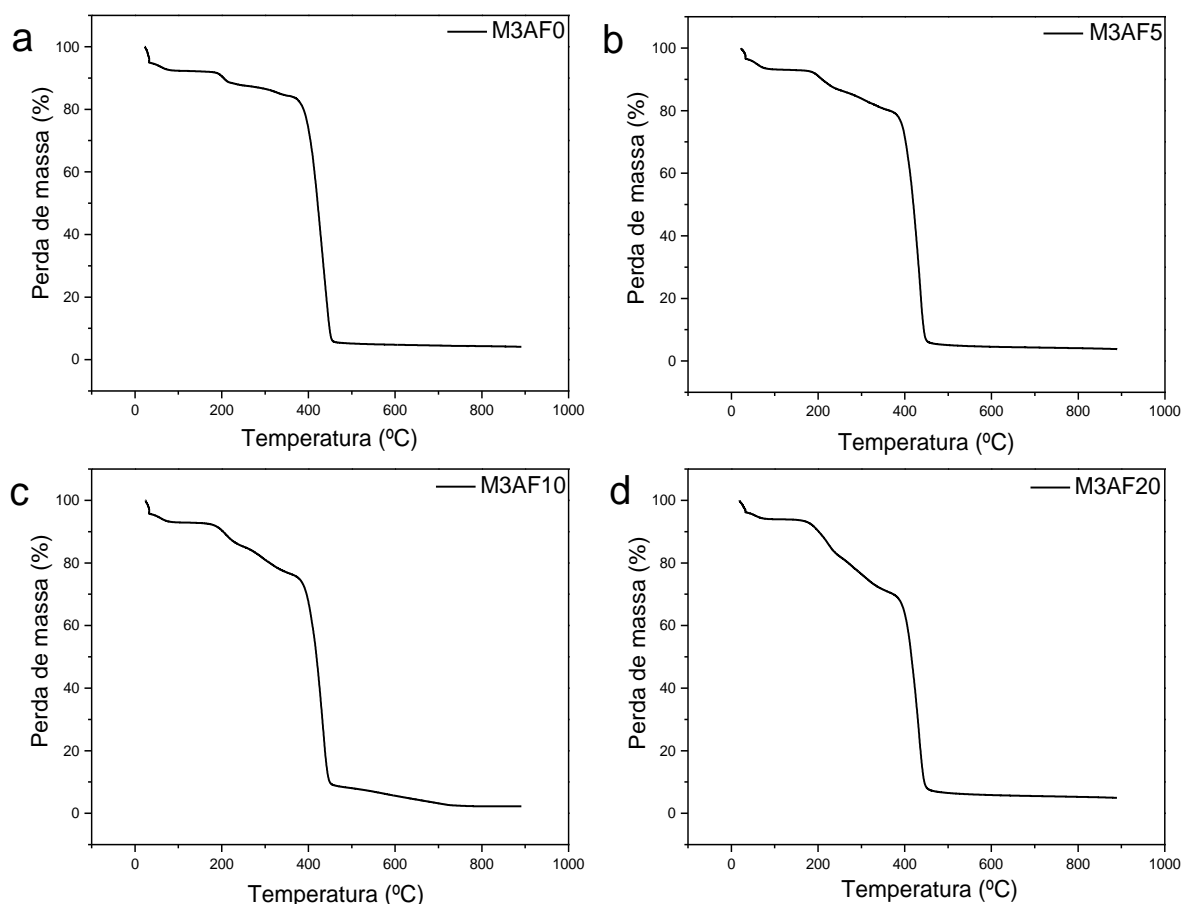
FONTE: O autor (2016).

5.2.8 Análise Térmica

5.2.8.1 Análise termogravimétrica (ATG)

As curvas de ATG obtidas para as micropartículas do sistema S2 (M3AF0, M3AF5, M3AF10 e M3AF20) estão representadas na Figura 29. As formulações exibiram três eventos de decomposição térmica. A primeira fase de perda de massa foi associada à perda de água. A segunda e a terceira fase foram atribuídas a uma combinação da degradação da cadeia polimérica e do fármaco e da volatilização dos seus produtos de decomposição, respectivamente. Além disso, os termogramas indicaram que a temperatura de início de decomposição térmica de todas as micropartículas foi acima de 145 °C (M3AF0 = 178,4 °C; M3AF5 = 168,5 °C; M3AF10 = 166,1 °C; M3AF20 = 148,1 °C) sob fluxo de N₂, o que indica que as micropartículas do sistema S2 apresentaram uma estabilidade térmica adequada.

FIGURA 29 – CURVAS DE ATG DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2: M3AF0 (a), M3AF5 (b), M3AF10 (c) E M3AF20 (d)

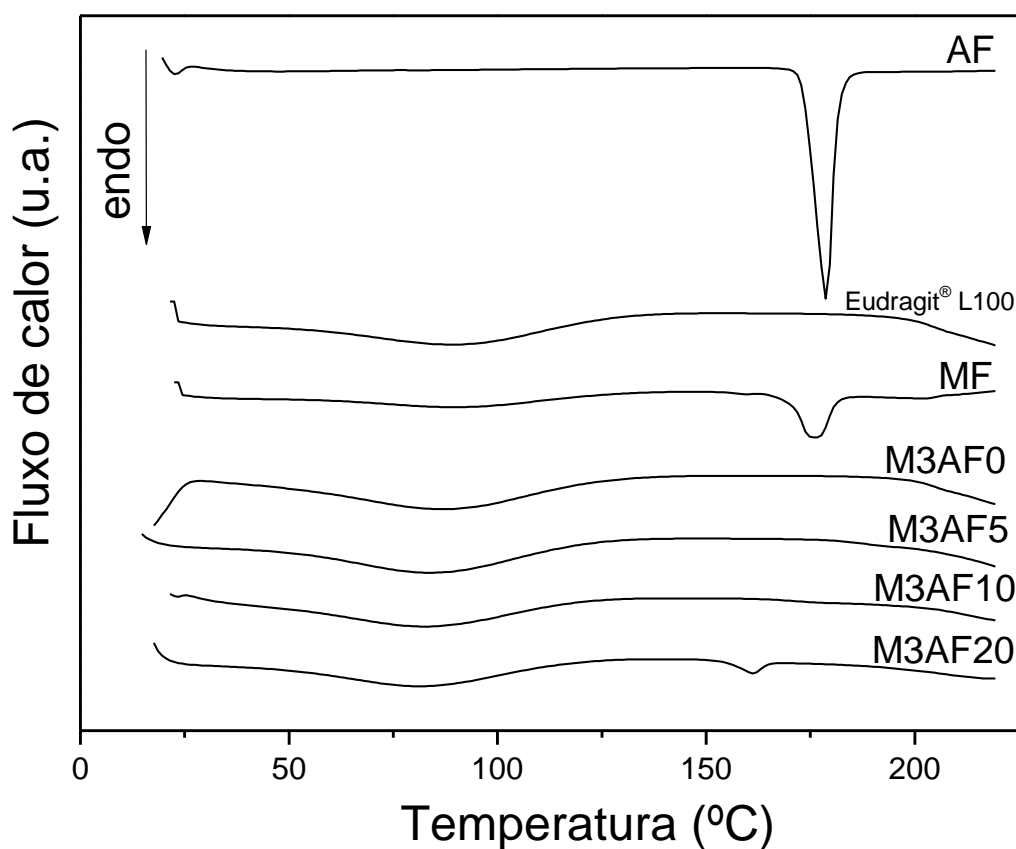


FONTE: O autor (2016).

5.2.8.2 Calorimetria exploratória diferencial (CED)

Os termogramas do ácido ferúlico, do Eudragit[®] L100, da mistura física (1:1) e das micropartículas do sistema S2, avaliados por CED, estão mostrados na Figura 30. Para o ácido ferúlico, foi observado um único evento térmico de fusão em 175,2 °C, resultado condizente com o especificado na literatura para esse fármaco (ANSELM I et al., 2006). O evento de fusão típico do AF não foi observado nas curvas de CED das micropartículas de Eudragit[®] L100. Este comportamento térmico sugere que ocorreu uma amorfização do fármaco. O resultado foi confirmado pelos padrões de difração de raios X, nos quais foi constatada a ausência dos picos de cristalinidade do fármaco nas micropartículas.

FIGURA 30 – TERMOGRAMAS OBTIDOS POR CED DO ÁCIDO FERÚLICO, DO EUDRAGIT[®] L100, DA MISTURA FÍSICA (MF) (AF: EUDRAGIT[®] L100, 1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS M3AF0, M3AF5, M3AF10 E M3AF20 QUE INTEGRAM O SISTEMA S2

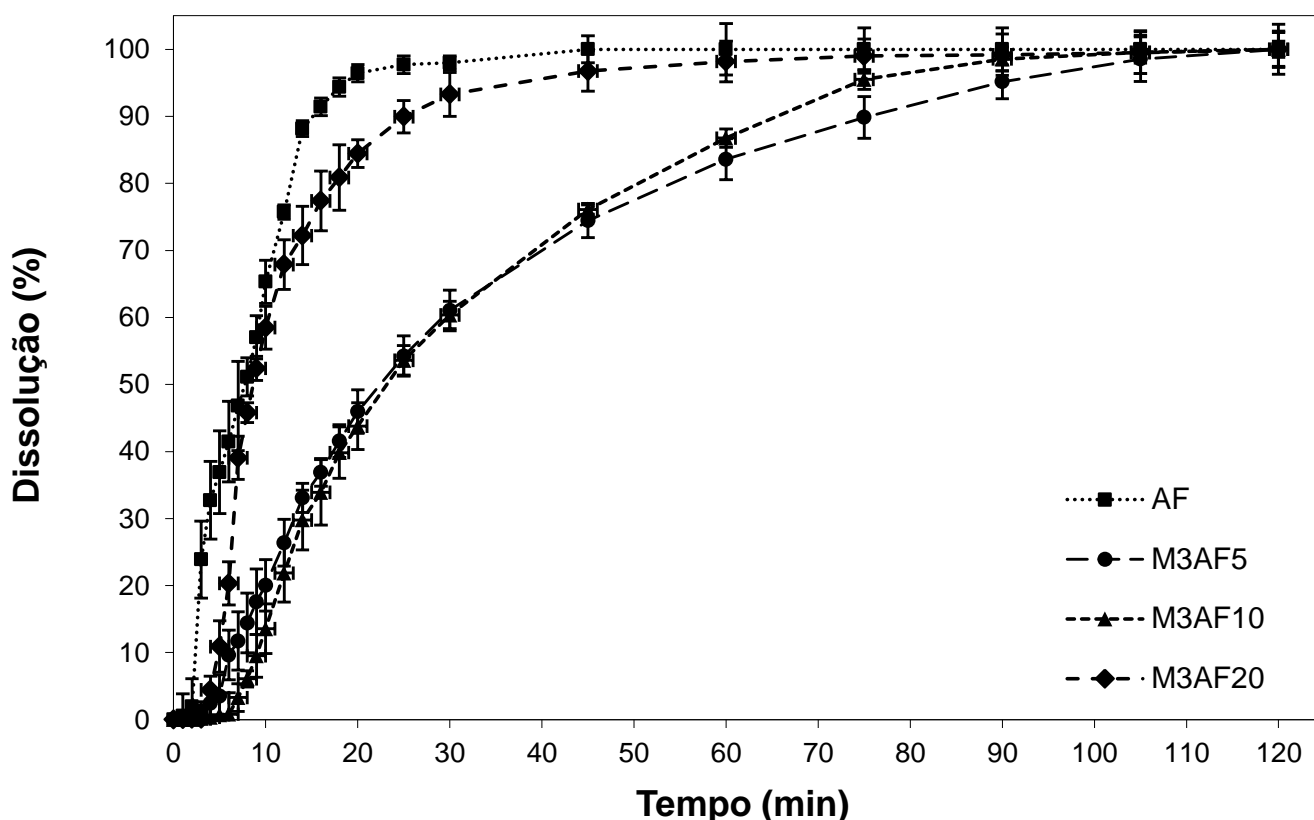


FONTE: O autor (2016).

5.2.9 Estudo de Liberação *In Vitro*

Os perfis de liberação obtidos para o AF puro e para as micropartículas poliméricas do sistema S2 estão apresentados na Figura 31. Quando da avaliação do fármaco puro, uma liberação de 80% foi obtida em 12,69 min. Entretanto, as formulações do sistema S2 demonstraram a liberação de 80% do AF contido nas micropartículas nos tempos médios de 54 min (M3AF5), 50,5 min (M3AF10) e 17,50 min (M3AF20). Dessa forma, esses resultados demonstraram que as micropartículas contendo ácido ferúlico foram efetivas em promover uma taxa de dissolução mais lenta do que a do fármaco puro.

FIGURA 31 – PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO FÁRMACO PURO E DAS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2



FONTE: O autor (2016).

As formulações M3AF5 (5% de ácido ferúlico) e M3AF10 (10% de ácido ferúlico) apresentaram um perfil de liberação estatisticamente mais lento do que o fármaco puro. A maior quantidade de polímero nestas formulações provavelmente proporcionou um melhor controle na taxa de dissolução do fármaco. O Eudragit® L100 é um polímero metacrílico amplamente utilizado em sistemas de liberação de fármacos por via oral. O Eudragit® L100 é um polímero pH-responsivo cujo limiar de dissolução é em pH 6,0 (RIZI et al., 2011). Portanto, o ensaio de dissolução das micropartículas preparadas por secagem por aspersão realizado em pH 7,0 demonstrou uma liberação controlada do fármaco, atribuída as características do material polimérico.

Considerando a eficiência de dissolução, um valor de 91,21% foi calculado para o fármaco puro, após 2 horas, enquanto que as micropartículas de Eudragit® L100 apresentaram valores de eficiência de dissolução de 68,43% (M3AF5), 74,72% (M3AF10), e 78,84% (M3AF20) no mesmo intervalo de tempo. De modo a comparar a porcentagem dissolvida entre as formulações em cada intervalo de tempo, teste ANOVA *one-way* foi usado com o teste de Tukey *post hoc*. Esta análise indicou uma diferença estatisticamente significativa entre o fármaco puro e as formulações M3AF5 ($p = 0,0013$) e M3AF10 ($p = 0,0006$). No entanto, o AF puro e a formulação M3AF20 não apresentaram diferenças estatísticas ($p = 0,3608$).

Os perfis de liberação foram ajustados aos modelos matemáticos e a seleção do melhor modelo foi realizada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (r) e para o critério de seleção do modelo (MSC). Ainda assim, foi analisada a coerência dos valores encontrados para as constantes cinéticas de liberação e o ajuste gráfico verificado para cada equação e os resultados estão demonstrados na Tabela 16. O perfil de liberação das micropartículas do sistema S2 revelou um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo monoexponencial, em relação aos outros modelos matemáticos avaliados.

De modo a investigar o potencial *in vitro* e os efeitos *in vivo* das micropartículas preparadas por secagem por aspersão contendo AF, a formulação M3AF10 foi selecionada, devido à sua morfologia e tamanho apropriados, conteúdo de fármaco e eficiência de encapsulação, dispersão molecular adequada do fármaco na matriz polimérica, e um padrão de liberação controlada.

TABELA 16 – RESULTADOS DA MODELAGEM MATEMÁTICA PELA EQUAÇÃO MONOEXPONENCIAL PARA O ÁCIDO FERÚLICO PURO E PARA AS MICROPARTÍCULAS DO SISTEMA S2

Material	Modelo Monoexponencial		
	MSC	R	K (min ⁻¹)
Ácido ferúlico (AF)	2,89	0,9905	0,1050
M3AF5	3,93	0,9975	0,0288
M3AF10	2,84	0,9931	0,0270
M3AF20	2,39	0,9773	0,0740

5.2.10 Ensaio *In Vitro* de Cultivo Celular

A fim de verificar se as micropartículas de Eudragit® L100 apresentavam ação citotóxica frente às células J774A.1, o ensaio de redução de MTT foi realizado. Os efeitos do AF puro e da micropartícula M3AF10 sobre a viabilidade celular frente às células tumorais J774A.1 estão demonstrados na Figura 32,A.

O ensaio de redução do MTT é um teste colorimétrico cuja absorbância reflete a viabilidade celular que pode ser empregado para avaliar a citotoxicidade de uma variedade de compostos químicos. O MTT é um sal solúvel de tetrazólio amarelo que é reduzido a cristais de formazan de coloração violeta, com base na atividade da desidrogenase mitocondrial/não-mitocondrial em células viáveis (DOLL-BOSCARDIN et al., 2012; BERRIDGE & TAN, 1993; MOSMANN, 1983).

Os resultados do ensaio de MTT (Figura 32,A) demonstraram a ausência de citotoxicidade do AF puro e da formulação M3AF10 em relação às células J774A.1 após o período de 48 h de incubação nas concentrações de 25 a 200 µM. Portanto, não houve alteração na atividade enzimática da desidrogenase, mantendo a viabilidade celular. Além disso, tanto o fármaco puro quanto a micropartícula M3AF10 promoveram uma indução na proliferação celular estatisticamente significativa na concentração de 200 µM em comparação com o controle, o que levou a um interesse em investigar o efeito citoprotetor do AF.

No ensaio de avaliação do efeito citoprotetor, as células J774A.1 foram expostas ao AF puro e a formulação M3AF10 durante 48 h, e submetidas a exposição aguda de 600 μM de H_2O_2 , a fim de induzir o estresse oxidativo (Figura 32,B). O potencial *in vitro* do fármaco puro e das micropartículas de Eudragit® L100 em reverter os danos celulares foram avaliados pelo ensaio de redução do MTT.

O fármaco puro forneceu um efeito citoprotetor não significativo ($p < 0,05$) em relação ao tratamento com H_2O_2 . Por outro lado, a micropartícula M3AF10 preveniu significativamente a morte celular induzida por H_2O_2 nas concentrações de 50, 100 e 200 μM em comparação com o controle, o que aumentou a viabilidade celular para $80,5 \pm 2,3$, $128,5 \pm 9,5$ e $138,8 \pm 10,3\%$, respectivamente.

Portanto, apenas a formulação M3AF10 foi capaz de evitar lesões oxidativas induzida por H_2O_2 em células J774A.1. O estresse oxidativo ocorre quando a homeostase celular, que normalmente envolve um equilíbrio delicado entre a geração de radicais livres e a sua desintoxicação por antioxidantes, é perturbado (PICONE; NUZZO; DI CARLO, 2013). O H_2O_2 é bem conhecido por atuar como um potente indutor de espécies reativas de oxigênio (ROS) e é capaz de induzir a lesão celular tanto *in vitro* como *in vivo* (KIM et al., 2012; TERASHVILI et al., 2012). O H_2O_2 é particularmente conhecido por induzir a dano oxidativo, levando a peroxidação lipídica, a geração de ROS, o esgotamento da glutathiona reduzida e a redução da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase) antes da morte celular (BRENNER et al., 2010; GULDEN et al., 2010).

Em comparação com o fármaco puro, apenas as micropartículas de Eudragit® L100 demonstraram um efeito citoprotetor que poderia estar relacionado com o perfil de liberação controlada da formulação M3AF10. Assim, é possível sugerir que as micropartículas de Eudragit® L100 contendo AF podem oferecer um sistema polimérico viável para proporcionar citoproteção mantendo o efeito antioxidante do AF por um intervalo de tempo prolongado.

Os efeitos do AF puro e das micropartículas sobre a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS em células cultivadas J774A.1 estão apresentados na Figura 32,C. Na concentração de 50 μM , não foi observado efeito significativo do fármaco puro e da micropartícula M3AF10. No entanto, o AF e a

formulação M3AF10 inibiram significativamente a produção de NO na concentração de 100 μ M quando comparado ao grupo controle.

Um estímulo inflamatório tal como o LPS pode ativar macrófagos J774A.1 de murídeo a produzir uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandina E_2 e NO (GELLER & BILLIAR, 1998). A utilização do LPS promove aumento da produção de NO pela indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Macrófagos ativados por LPS expressam a óxido nítrico-sintase transcricionalmente induzida, que produz grandes quantidades de NO a partir da L-arginina (ZAMORA; VODOVOTZ; BILLIAR, 2000). As substâncias que podem inibir a produção de NO têm potencial como fármacos anti-inflamatórios e imunomoduladores (DOLL-BOSCARDIN et al., 2012). Tanto o AF puro como as micropartículas de Eudragit[®] L100 proporcionaram uma redução estatisticamente significativa da produção de NO na concentração de 100 μ M. Este resultado despertou o interesse em investigar a atividade potencial imunomoduladora e anti-inflamatória *in vivo* das micropartículas de Eudragit[®] L100 contendo AF.

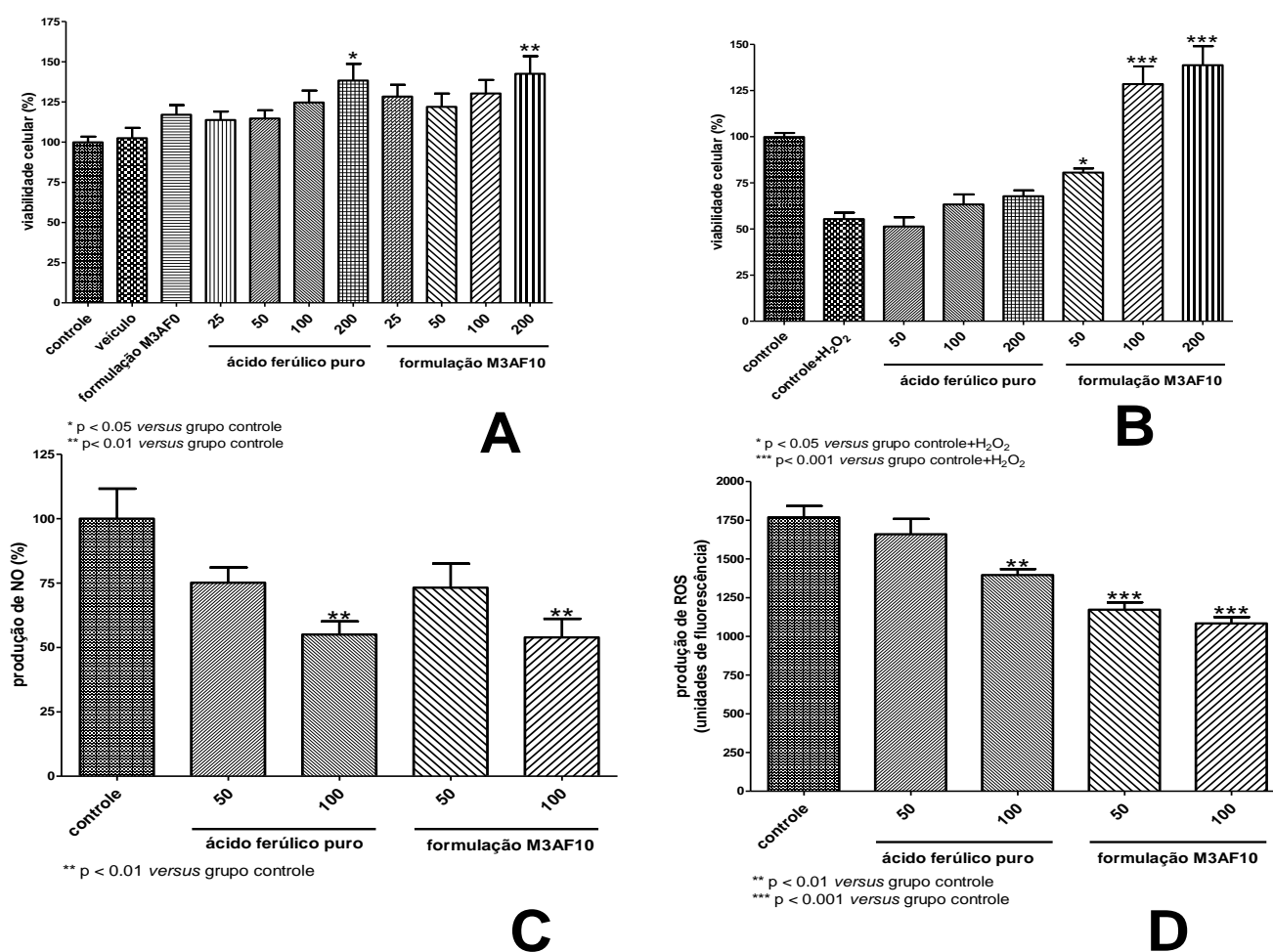
A capacidade do fármaco puro e da micropartícula M3AF10 para evitar a produção de oxidantes intracelulares em células J774A.1 foi avaliada utilizando o composto DCFH-DA (Figura 32,D). 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína na forma de diacetato (DCFH-DA) é utilizado para medir o estresse oxidativo em células, devido à elevada sensibilidade dos ensaios baseados em fluorescência. O ensaio consiste na oxidação do DCFH (após hidrólise da forma de diacetato) de fluoresceína por intermediários do tipo ferril e/ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), cuja fluorescência pode ser medida a 522 nm (BONINI et al., 2006). Por isso, este ensaio pode ser útil para quantificar a produção de ROS/RNS intracelular, a fim de explorar o efeito antioxidante.

A intensidade de fluorescência diminuiu estatisticamente após 24 h de exposição do AF puro na concentração de 100 μ M em comparação com o controle. No entanto, a formulação M3AF10 proporcionou uma redução significativa na produção de ROS intracelular, mesmo na mais baixa concentração avaliada (50 μ M), alcançando uma redução de 38,8% na intensidade de fluorescência (comparado ao grupo controle) na concentração de 100 μ M.

Os resultados mostraram que as micropartículas de AF apresentaram um efeito superior ao AF puro na redução da produção intracelular de ROS/RNS mesmo

na concentração de 50 μM . Este efeito também pode ser atribuído ao padrão de liberação controlada da formulação M3AF10 e reforça os resultados do efeito citoprotetor.

FIGURA 32 – RESULTADOS DO ENSAIO DE CULTURA CELULAR *IN VITRO* PARA O ÁCIDO FERÚLICO PURO E A FORMULAÇÃO M3AF10 USANDO A LINHAGEM CELULAR DE MACRÓFAGO J774A.1. **A** VIABILIDADE CELULAR AVALIADA PELO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO. **B** EFEITO CITOPROTETOR CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR H_2O_2 . **C** PRODUÇÃO DE NO INDUZIDA POR LPS EM CÉLULAS J774A.1 MENSURADA APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO. **D** PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS J774A.1 UTILIZANDO A SONDA DE FLUORESCÊNCIA DCFH-DA. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA ($n = 6$). OS ASTERISCOS INDICAM NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE: SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ AND $***p < 0,001$, TESTE *POST HOC* DE TUKEY.



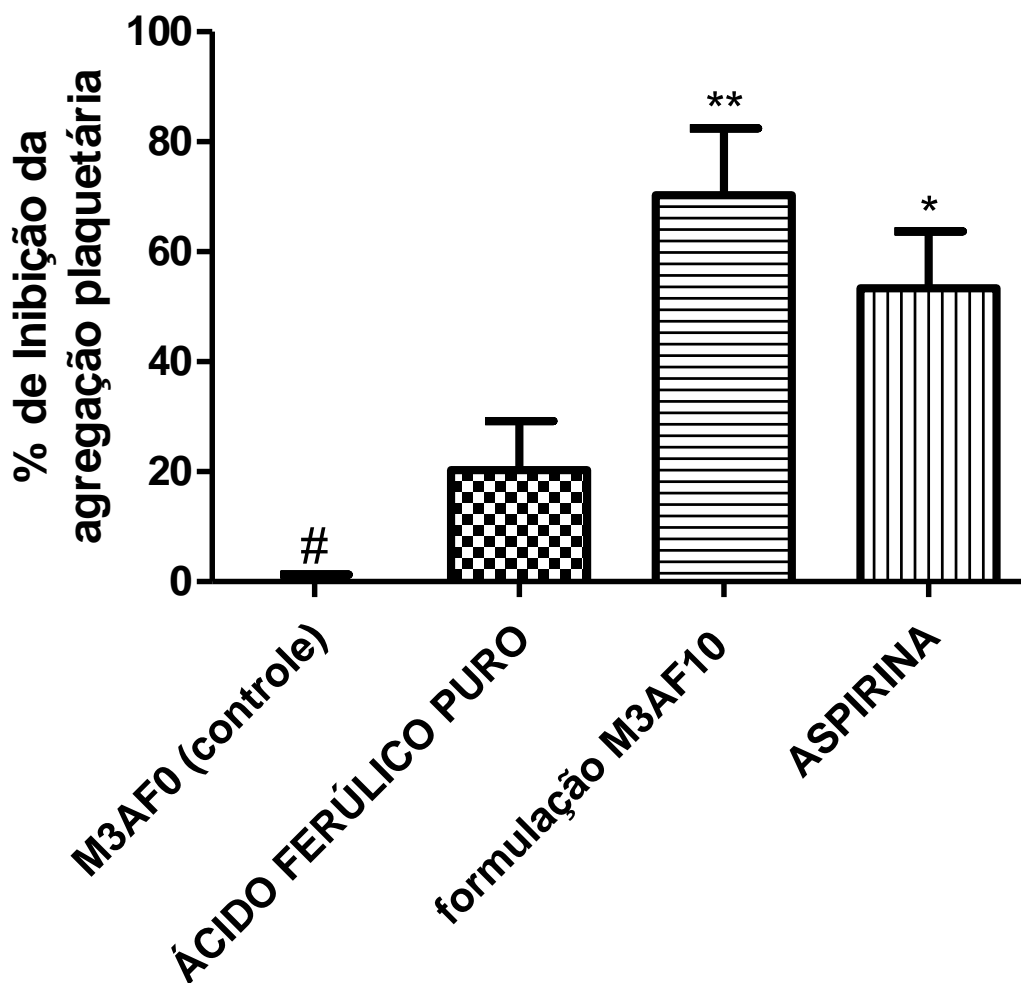
FONTE: O autor (2016).

5.2.11 Ensaio *In Vivo* da Atividade Antiagregante Plaquetária

O efeito *in vivo* da micropartícula M3AF10 do sistema S2 na inibição da agregação plaquetária estimulada por colágeno foi realizado 6 h após a última dose administrada e é apresentado na Figura 33. A micropartícula M3AF0 foi utilizada como controle, pois não promoveu a inibição da agregação plaquetária. A formulação M3AF10 e a aspirina apresentaram um efeito antiplaquetário estatisticamente significativo em relação ao controle. No entanto, o AF puro não teve um efeito estatisticamente significativo sobre a inibição da agregação plaquetária quando comparado ao grupo controle.

Substâncias com propriedades antiplaquetárias são usadas como fármacos convencionais de primeira linha para a prevenção e a cura de doenças tromboarteriais (STEINHUBL; BERGER; MANN III, 2002). O AF e os seus derivados são bem conhecidos como agentes antiplaquetários porque eles podem ativar a circulação do sangue para dissipar a estase sanguínea (ZHANG et al., 2015). No entanto, este efeito farmacológico é rápido porque o AF pode ser intensivamente metabolizado pela microbiota do intestino e pelo fígado, sendo submetido à hidrogenação da insaturação, desmetilação e desidroxilação seletiva em C4 para formar uma multiplicidade de metabólitos fenólicos relacionados (ZHANG et al., 2015). Os nossos resultados demonstraram que o AF puro não mostrou nenhum efeito estatisticamente significativo em comparação com o grupo controle (formulação M3AF0) 6 h depois da última dose administrada. No entanto, a formulação M3AF10 apresentou um efeito antiagregante plaquetário superior ao da aspirina que é considerada o fármaco padrão na terapia antiplaquetária (SCHRÖR, 1997). Dessa forma, as micropartículas do sistema S2 inibiram a agregação plaquetária durante um intervalo de tempo mais longo provavelmente por terem promovido um controle na dissolução do fármaco. Esses resultados demonstram que as micropartículas de Eudragit® L100 contendo AF podem proporcionar um efeito prolongado na atividade antiplaquetária *in vivo* do AF podendo ser considerado como um novo sistema polimérico para tratar eventos trombóticos arteriais.

FIGURA 33 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DA FORMULAÇÃO M3AF0 (CONTROLE), DA FORMULAÇÃO M3AF10 E DA ASPIRINA. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA A PARTIR DE 8 ENSAIOS INDEPENDENTES. OS ASTERISCOS INDICAM OS NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE: SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, $*p < 0,05$ E $**p < 0,01$, TESTE DE BONFERRONI



FONTE: O autor (2016).

5.3 SISTEMA S3: DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO FORMULADAS PELO MÉTODO DE SECAGEM POR ASPERSÃO

As dispersões sólidas de ácido ferúlico foram obtidas com sucesso pelo método de secagem por aspersão a partir dos polímeros PVP-K30, PEG 6000 e PLX-188. Após a obtenção, as formulações preparadas a partir do PVP-K30 e do PEG 6000 apresentaram aspecto macroscópico pulverulento de pó. No entanto, as formulações desenvolvidas com o PLX-188 resultaram em um aspecto líquido, viscoso e pegajoso no frasco coletor que se alterou para um aspecto sólido após o arrefecimento. Este resultado pode estar relacionado com o baixo valor de T_g teórico da mistura (CHAN et al., 2015), o qual foi inferior ao utilizado como temperatura de saída de ar no processo de secagem por aspersão (50 ± 5 °C). Todas as dispersões sólidas obtidas ficaram com uma cor amarelo pálida semelhante a do ácido ferúlico puro.

5.3.1 Rendimento

Com base na Equação 3, foi possível calcular o rendimento para as formulações de dispersões sólidas preparadas. A Tabela 17 sumariza os resultados percentuais, apresentados na forma de valor médio e desvio padrão.

Valores médios inferiores a 50% foram obtidos para todas as formulações e estão de acordo com os valores relatados na literatura (CHAN et al., 2015) devido a uma perda na parede da câmara do secador durante o processo de secagem, levando a um baixo rendimento do produto (SINGH & DIXIT, 2014). Em particular, a formulação PEG 6000 10% apresentou um rendimento estatisticamente mais elevado do que as formulações PVP-K30 20%, PLX-188 10% e PLX-188 de 20% ($p < 0,05$).

TABELA 17 – RENDIMENTO E TEOR DE FÁRMACO OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES DO SISTEMA S3

Formulação	Ácido ferúlico inicial (g)	Rendimento (%)	Teor de Fármaco (%)
PVP-K30 10%	0,200	36,0 ± 1,4	101,96 ± 0,79
PVP-K30 20%	0,400	32,9 ± 3,4	100,28 ± 1,15
PEG 6000 10%	0,200	46,1 ± 4,9	98,82 ± 1,54
PEG 6000 20%	0,400	39,2 ± 4,4	101,23 ± 1,41
PLX 188 10%	0,200	27,9 ± 5,5	86,86 ± 8,53
PLX 188 20%	0,400	27,2 ± 3,5	73,44 ± 9,25

* média (n = 3) ± desvio padrão

5.3.2 Determinação do Teor de Umidade

O conteúdo de água pode ser considerado como um parâmetro crítico para o desempenho da dissolução e a da estabilidade de uma dispersão sólida (KANAUJIA et al., 2011; JØRGENSEN & TORSTENSON, 2008). Produtos contendo baixo teor de umidade apresentam melhor estabilidade em relação aos que tem alto conteúdo de água. Este parâmetro pode determinar a estabilidade física e o desempenho geral da dispersão sólida, uma vez que irá afetar a tendência de cristalização da dispersão sólida amorfa. Por isso, é fundamental determinar o teor de água da dispersão sólida (CHAN et al., 2015).

A Tabela 18 fornece os resultados referentes ao teor de água presente nas dispersões sólidas, frente aos valores obtidos para o ácido ferúlico puro (1,47%) e os polímeros de partida: PVP-K30 (18,23%), PEG 6000 (1,46%) e PLX 188 (1,48%).

As dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão demonstraram valores de teor de água semelhantes aos dos polímeros de partida. Um baixo teor de umidade foi obtido para as formulações preparadas com PEG 6000 e PLX-188 o que demonstra que as condições de secagem foram devidamente selecionadas. Devido ao seu baixo teor de umidade, estas formulações podem ser mais estáveis do que as que foram preparadas utilizando o PVP-K30. A presença de elevado teor de água nas formulações PVP-K30 10% e PVP-K30 20% mostra que estes produtos não foram completamente secos durante o processo de secagem por aspersão. Além disso, pode-se ainda atribuir a elevada higroscopicidade do PVP (CALLAHAN et al., 1982).

TABELA 18 – TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ÁCIDO FERÚLICO, PARA OS POLÍMEROS DE PARTIDA (PVP-K30, PEG 6000 E PLX-188) E PARA AS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3

Material (g)	Umidade (%)
Ácido ferúlico	1,47 ± 0,12
PVP-K30	18,23 ± 0,14
PEG 6000	1,46 ± 0,09
PLX 188	1,48 ± 0,19
PVP-K30 10%	17,76 ± 0,08
PVP-K30 20%	15,73 ± 0,12
PEG 6000 10%	2,03 ± 0,24
PEG 6000 20%	2,87 ± 0,19
PLX 188 10%	2,72 ± 0,07
PLX 188 20%	2,22 ± 0,09

*média (n = 3) ± desvio padrão

5.3.3 Estudo de Solubilidade

O ácido ferúlico tem solubilidade em água de $6,47 \pm 0,08 \text{ mg.dL}^{-1}$ a $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ semelhante ao relatado na literatura (SAIJA et al., 2000). Considerando-se que este valor de solubilidade foi definido como 100%, todas as dispersões sólidas melhoraram a solubilidade relativa do ácido ferúlico. Foram observados aumentos de $171,66 \pm 3,17\%$, $96,12 \pm 2,49\%$, $203,21 \pm 4,05\%$, $152,11 \pm 2,42\%$, $214,73 \pm 3,42\%$ e $163,06 \pm 2,98\%$ para PVP-K30 10%, PVP-K30 20%, PEG 6000 10%, PEG 6000 20%, PLX-188 10% e PLX-188 20%, respectivamente. Estes dados indicam que a solubilidade do ácido ferúlico nestas formulações foi inicialmente dependente do tipo e da concentração do polímero de partida. O melhor resultado foi obtido para formulação PLX-188 10% em que a proporção PLX-188:AF foi de 9:1.

O PVP-K30 e o PEG 6000 são carreadores poliméricos amplamente utilizados para preparar dispersões sólidas de segunda geração. Esses agentes de solubilização são capazes de originar dispersões sólidas amorfas (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Os sistemas poliméricos podem reduzir o tamanho das partículas do fármaco a um nível quase molecular, solubilizar ou co-dissolver o fármaco, proporcionar uma melhor molhabilidade e dispersibilidade do fármaco no

material veicular (MURTAZA et al., 2014; OHARA et al., 2005; LEUNER & DRESSMAN, 2000) que em conjunto conduzem a uma melhor solubilidade relativa do fármaco. O PLX-188 é altamente solúvel em água, agente tensoativo polimérico utilizado para obter dispersões sólidas de terceira geração. A presença de blocos de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (PO) na estrutura do PLX-188 resulta em uma estrutura anfifílica, a qual tem propriedades de se auto-organizar em micelas quando em solução aquosa (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002); o núcleo hidrófobo (bloco PO) pode agir como reservatório para o fármaco, enquanto que a porção hidrofílica (EO) atua como interface entre o meio aquoso e o fármaco. Em concentrações mais elevadas, estas micelas monomoleculares associam-se para formar agregados de tamanho variável, que têm a capacidade de solubilizar fármacos e para aumentar a estabilidade dos agentes solubilizantes (JONES & LEROUX, 1999). A solubilização provavelmente ocorre por meio de um mecanismo sequencial. No estado seco, as partículas de fármaco permanecem em contato direto ou aderidas às partículas do polímero devido à mistura íntima. Quando a mistura entra em contato com a água, as partículas do polímero sofrem hidratação rapidamente e, em solução, passam a solubilizar as partículas de fármaco adjacentes e, subsequentemente, liberam o fármaco para o meio (CHEN et al., 2004). Nesse sentido, a ação combinada da atividade superficial, a solubilização e as propriedades molhantes podem, possivelmente, explicar a solubilidade relativa mais elevada do ácido ferúlico usando o PLX-188 do que os observados quando utilizou-se o PVP-K30 e o PEG 6000. Além disso, foram observados os melhores resultados para as formulações que contêm uma maior concentração de polímero (PLX-188 10%, PEG 6000 10% e PVP-K30 10%), na qual um maior efeito de solubilização do fármaco foi evidenciado.

5.3.4 Teor de Fármaco

O teor de fármaco para as dispersões sólidas está resumido na Tabela 17. Valores próximos a 100% foram obtidos para as formulações preparadas usando PVP-K30 e PEG 6000. Além disso, as dispersões sólidas de PVP-K30 e PEG 6000 mostraram baixos valores de desvio padrão para o teor de fármaco que apontam para uma distribuição uniforme do AF nestas formulações. Portanto, as condições de secagem demonstraram ser reprodutíveis para a preparação destas dispersões

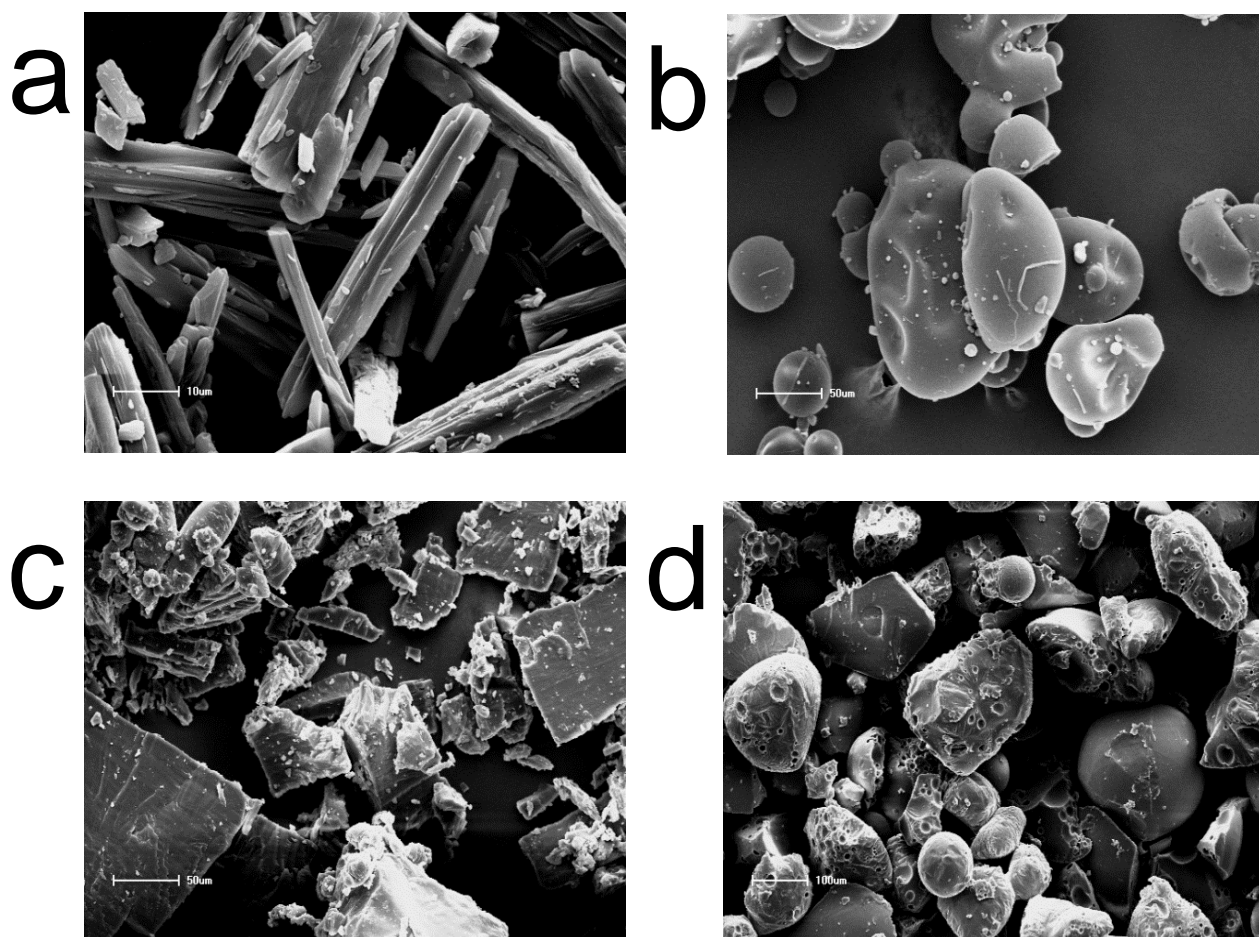
sólidas (SHARMA & JAIN, 2010). No entanto, as formulações de PLX-188 mostraram um baixo teor de fármaco e um alto desvio padrão, o que sugere uma distribuição do fármaco inadequada no polímero. Estes resultados podem estar relacionados com as condições de secagem utilizadas. Mesmo operando a uma baixa temperatura do ar de saída, os produtos contendo o PLX-188 resultaram em um líquido viscoso e pegajoso que se tornou sólido após o arrefecimento. Processos de recristalização do fármaco e separação de fases podem ter ocorrido durante o arrefecimento o que levou a baixos valores de teor de fármaco tal como foi previamente relatado (WEUTS et al., 2005).

5.3.5 Análises Morfológicas e de Superfície

Os resultados obtidos por MEV para o AF e para os polímeros de partida estão indicados na Figura 34, sendo que as micrografias foram obtidas em aumento de 240 vezes. Foi observado que o fármaco (Figura 34,a) apresentou uma morfologia cristalina. O polímero PVP-K30 (Figura 34,b) mostrou-se como partículas esféricas com algumas depressões na superfície e características de material amorfo. O PEG 6000 (Figura 34,c) exibiu partículas cristalinas grandes de tamanho irregular e o PLX-188 (Figura 34,d) mostrou partículas esféricas e/ou quase-esféricas com algumas depressões na superfície.

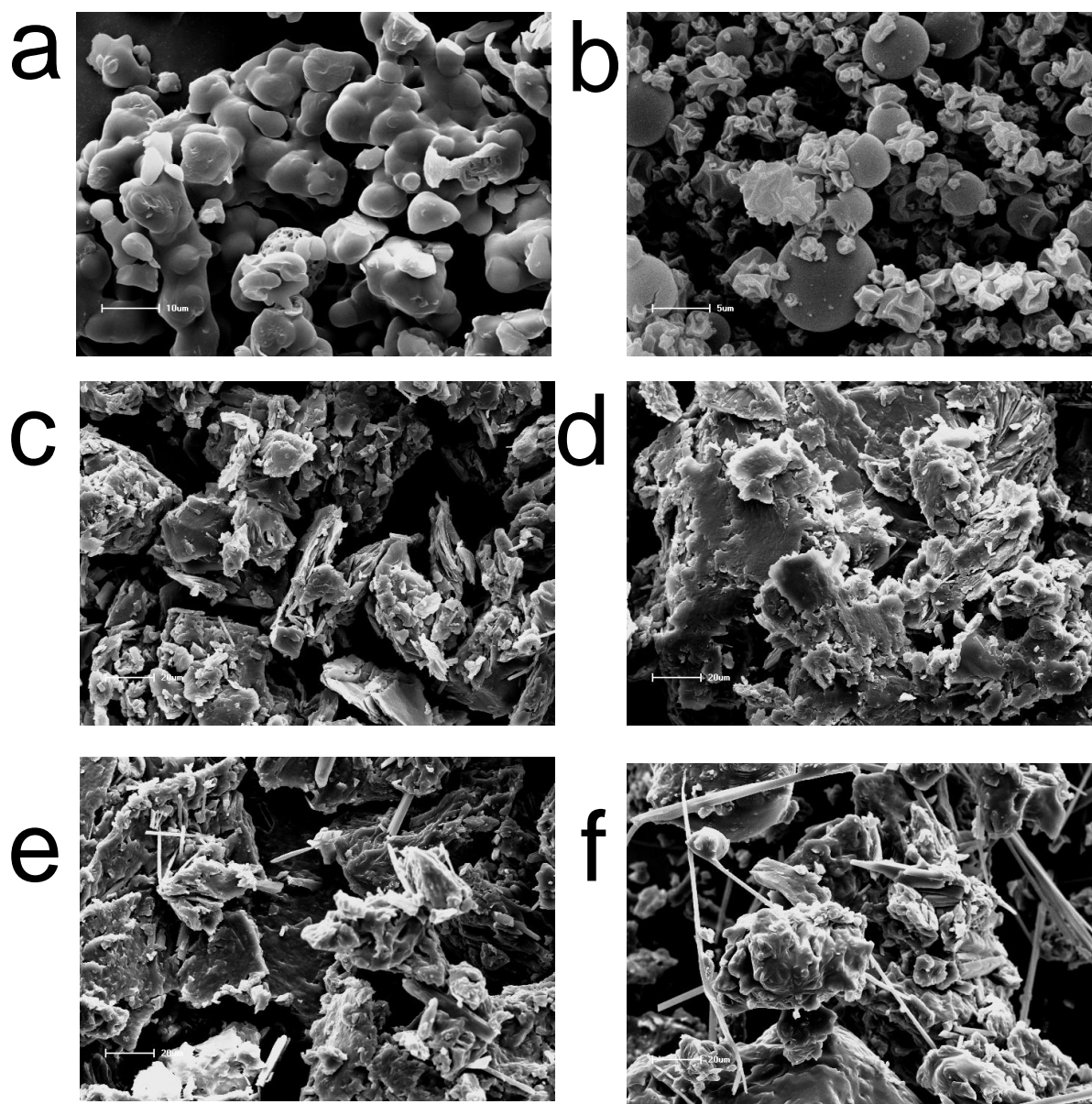
A avaliação por MEV das dispersões sólidas está representada na Figura 35. Em geral, novas morfologias foram observadas dependendo do polímero utilizado. As dispersões sólidas de PVP-K30 mostraram-se de formato esférico, com agregados enrugados e irregulares (Figura 35 a,b). As formulações preparadas a partir do PEG 6000 resultaram em um aspecto de agregados de tamanhos irregulares (Figura 35 c,d). Nas dispersões sólidas de PVP-K30 e PEG 6000 não foram observados a presença de cristais de ácido ferúlico na superfície das formulações. Entretanto, as dispersões sólidas preparadas com o PLX-188 revelaram-se como agregados irregulares contendo cristais de fármaco na superfície (Figura 35 e,f).

FIGURA 34 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÁCIDO FERÚLICO PURO (a) (AUMENTO DE 1200 X) E DOS POLÍMEROS PVP-K30 (b), PEG 6000 (c) E PLX-188 (d) POR MEV, AUMENTO DE 240 X



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 35 – MICROGRAFIAS DAS DISPERSÕES SÓLIDAS OBTIDAS POR MEV, PREPARADAS POR SECAGEM POR ASPERSÃO, AUMENTO DE 500 X, PVP-K30 10% (a), PVP-K30 20% (b), PEG 6000 10% (c), PEG 6000 20% (d), PLX-188 10% (e) E PLX-188 20% (f)



FONTE: O autor (2016).

Para as dispersões sólidas obtidas a partir do PVP-K30 e PEG 6000, a morfologia cristalina original do AF desapareceu, e não foi possível diferenciar a morfologia dos polímeros hidrofílicos. Portanto, a avaliação destas micrografias obtidas por MEV sugerem a presença de uma nova fase sólida, na forma de

agregados de tamanho irregular (GUEDES et al., 2011). Considerando os resultados evidenciados para as formulações de PVP-K30 e PEG 6000, é possível indicar a presença do AF como uma solução sólida no polímero conforme relatado anteriormente para dispersões sólidas de fenofibrato (BHISE et al., 2011). As formulações de PLX-188 mostraram estruturas cristalinas no formato de agulha na superfície dos agregados o que sugere que suspensões sólidas foram obtidas. No entanto, avaliações de raios X são necessárias a fim de investigar a cristalinidade destas formulações e discutir a possível estrutura desta interação fármaco-polímero na dispersão sólida (HUANG & DAI, 2014).

Além disso, a presença de cristais nas dispersões sólidas de PLX-188 pode estar relacionada com o processo de secagem por pulverização em que estas formulações mostraram em primeiro lugar, um aspecto líquido viscoso e pegajoso que mudou para um sólido após o arrefecimento. Dispersões sólidas devem formar um sistema termodinamicamente estável. No entanto, estas dispersões sólidas formaram-se somente após o arrefecimento, o que pode ter causado um processo de nucleação e precipitação do fármaco (HUANG & DAI, 2014).

5.3.6 Difração de Raios X

A literatura relata que o desenvolvimento de dispersões sólidas com características amorfas é crucial para garantir um desempenho adequado para estes sistemas (CHAN et al., 2015). Com o propósito de investigar a cristalinidade das dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão, em comparação com as misturas físicas e com o fármaco puro, foi realizada a avaliação de difração de raios X e os resultados são mostrados na Figura 36. No caso do fármaco puro, foram verificados diferentes picos relacionados com a sua estrutura cristalina, sendo que os principais picos aparecem em $2\theta = 9,02, 12,86, 15,62$ e $26,46^\circ$. Estes picos de difração de raios X foram também verificados nas misturas físicas o que indica a presença de cristais de AF nestas amostras. O PVP-K30 mostrou-se com características totalmente amorfas, enquanto o PEG 6000 revelou dois picos em $19,32$ e $23,34^\circ$ e o PLX-188 também apresentou dois picos em $19,27$ e $23,47^\circ$.

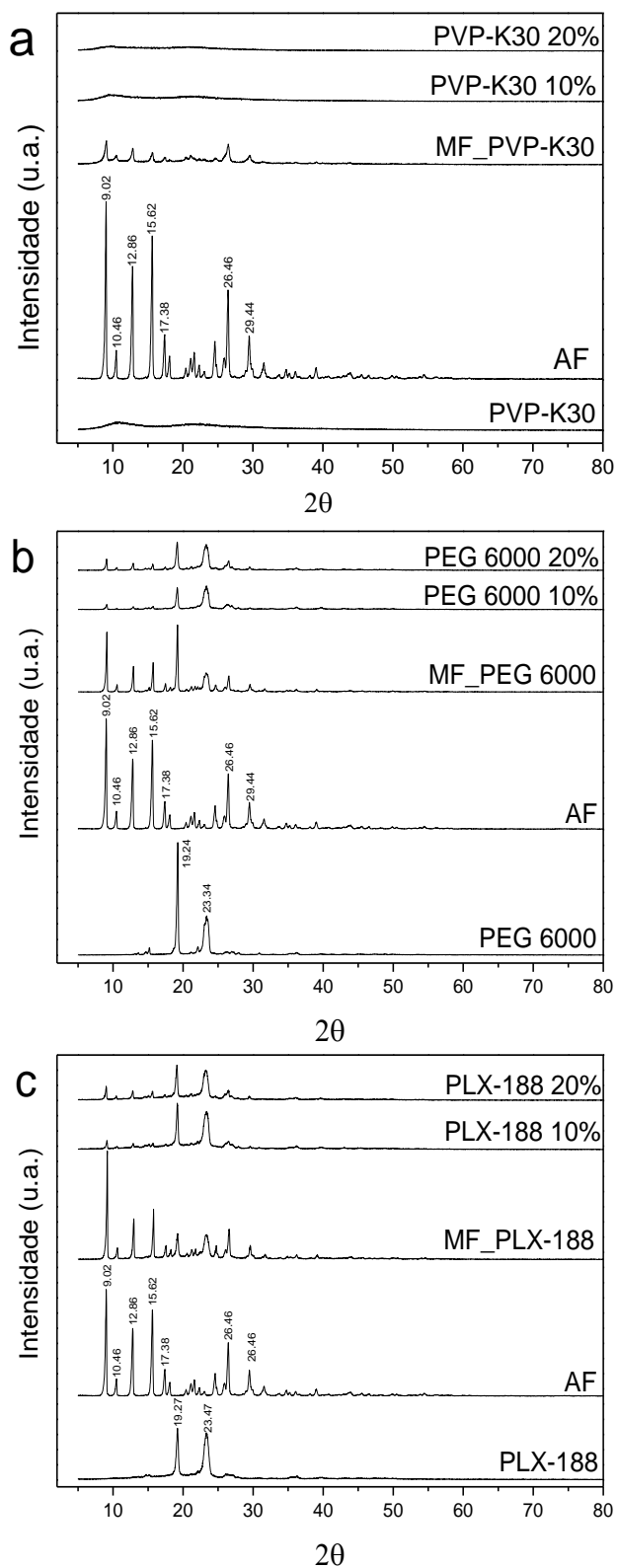
Os difratogramas das formulações preparadas usando o PVP-K30 demonstraram ausência de cristalinidade, o que caracteriza um material amorfo. Da mesma forma, as dispersões sólidas de PEG 6000 e PLX-188 apresentaram perfis

de difração com uma diminuição notável dos picos cristalinos do AF comparados com as respectivas misturas físicas. Estes dados confirmam que o procedimento de secagem por aspersão conduziu a amorfização do fármaco em diferentes intensidades e demonstra que cada polímero tem uma capacidade especial em reduzir a estrutura cristalina do AF (GUEDES et al., 2011).

Dispersões sólidas amorfas podem ser classificadas de acordo com a interação molecular entre o fármaco e o polímero carreador em soluções sólidas, suspensões sólidas ou em uma mistura de ambos (BHISE et al., 2011). Em soluções sólidas amorfas, o fármaco e o polímero são totalmente miscíveis e solúveis, originando uma interação molecular homogênea entre eles. Nesses sistemas, a energia de interação fármaco-carreador é extremamente elevada, resultando em uma solução verdadeira (LEUNER & DRESSMAN, 2000). Este tipo de dispersão sólida amorfa é homogênea a um nível molecular. Porém, as suspensões sólidas amorfas ocorrerem quando o fármaco tem uma solubilidade limitada ou o transportador um ponto de fusão extremamente alta. Molecularmente, a dispersão obtida não tem uma estrutura homogênea, mas é composta por duas fases (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Os padrões de difração sugerem que o PVP-K30 levou à obtenção de um sistema de solução sólido enquanto que o PEG 6000 e o PLX-188 podem ter resultado numa mistura de solução e/ou suspensão sólida. Para as formulações de PLX-188, esse resultado é confirmado pelas micrografias obtidas por MEV em que se podem observar cristais de AF.

De qualquer forma, os sistemas mais amorfos podem dissolver a uma velocidade mais rápida devido à maior energia interna e maior movimento molecular que melhoram as propriedades termodinâmicas relativas a materiais cristalinos (BOGDANOVA et al., 2005). Nesse sentido, ensaios de dissolução *in vitro* são necessários, a fim de avaliar o desempenho das formulações de dispersões sólidas que serão utilizadas para a avaliação do potencial *in vivo*.

FIGURA 36 – DIFRATOGRAMA DO ÁCIDO FERÚLICO (AF), PVP-K30 (a), PEG 6000 (b), PLX-188 (c), MISTURA FÍSICA (MF), E DISPERSÕES SÓLIDAS PREPARADAS POR SECAGEM POR ASPERSÃO DO SISTEMA S3



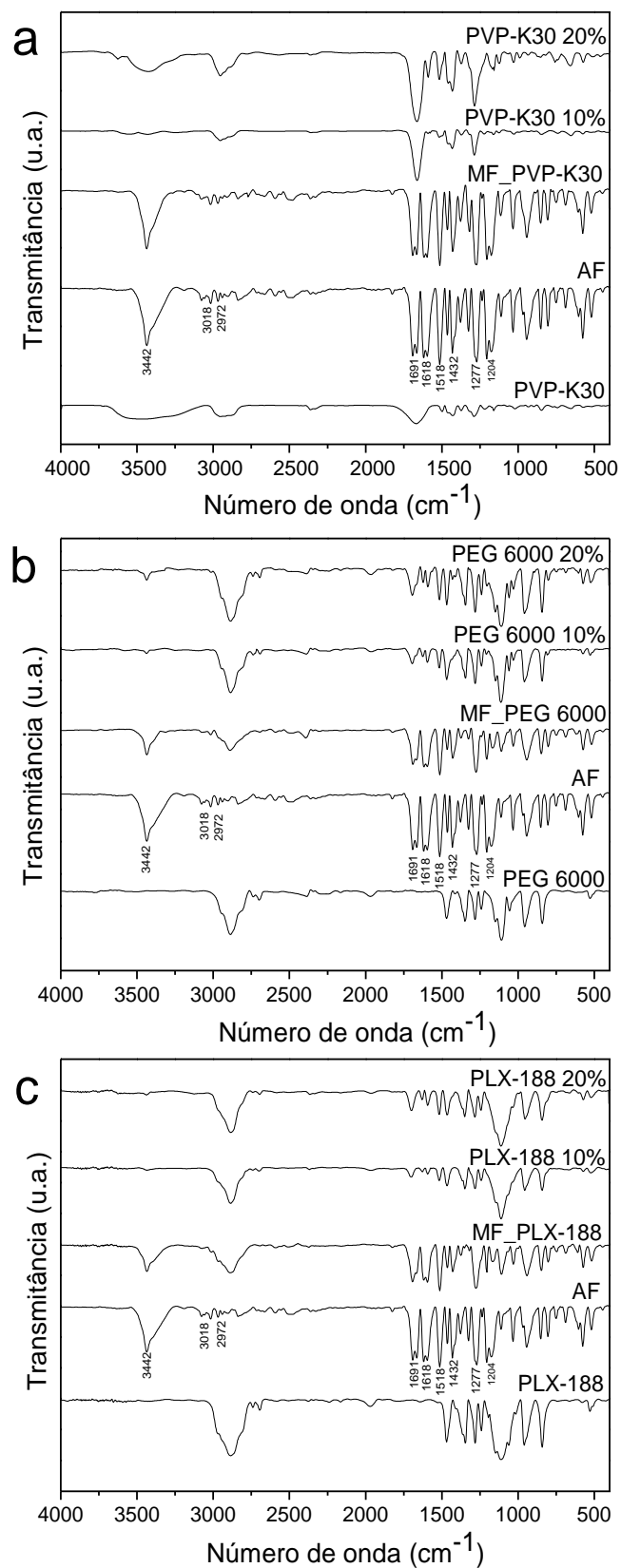
FONTE: O autor (2016).

5.3.7 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (IVTF)

A interação fármaco-polímero tem sido relatada na literatura como sendo importante para a estabilidade física da dispersão sólida de um sistema (CHAN et al., 2015). Por exemplo, a formação de pontes de hidrogênio entre o fármaco e as cadeias poliméricas pode tornar mais energeticamente favorável para o fármaco e polímero interagirem uns com os outros em vez de com eles próprios, resultando em alterações nos perfis de dissolução (HUANG & DAI, 2014). Portanto, a avaliação por espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada no presente estudo para investigar a interação entre o AF e os polímeros de partida nestes sistemas.

A Figura 37 mostra os espectros de IVTF do AF puro, dos polímeros de partida (PVP-K30, PEG 6000 e PLX-188), suas respectivas misturas físicas e as dispersões sólidas que compõem o sistema S3. O espectro de IVTF do AF puro indicou uma banda típica referente à vibração de deformação axial do grupamento OH (3442 cm^{-1}), vibrações de estiramento de C-H aromático e de alceno (3018 cm^{-1}), vibrações de estiramento de C-H de alcano (2972 cm^{-1}), vibração de estiramento de C=O conjugado ao anel aromático (1691 cm^{-1}), vibração de estiramento de C=C aromático ($1618, 1595, 1518, 1432\text{ cm}^{-1}$), vibração de estiramento assimétrico de C-O-C (1277 cm^{-1}) e vibração de estiramento de C-OH (1204 cm^{-1}). O espectro de IVTF do PVP-K30 apresentou uma banda alargada (3472 cm^{-1}) devido à presença de moléculas de água na estrutura do PVP que é um polímero altamente hidrofílico (FRIZON et al., 2013). Além disso, as bandas de vibração de estiramento C-H ($2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$) e de vibração de estiramento de C=O de amida terciária (1670 cm^{-1}) também foram assinaladas. Os espectros de IVTF do PEG 6000 e do PLX-188 mostraram duas bandas típicas de vibração de estiramento de C-H ($2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$) e de vibração de estiramento de C-O de éter alifático (1110 cm^{-1}). As bandas de absorção atribuídas a cada mistura física correspondem simplesmente à sobreposição dos espectros de IVTF do AF puro e do polímero.

FIGURA 37 – ESPECTROS IVTF DO ÁCIDO FERÚLICO (AF), DO PVP-K30, DO PEG 6000, DO PLX-188, DA MISTURA FÍSICA (MF) E DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3



FONTE: O autor (2016).

Formulações obtidas usando o PVP-K30 demonstraram alargamento e alterações envolvendo bandas de OH e C=O. Este resultado sugere que ligações intermoleculares $O-H\cdots O=C$ foram formadas entre o AF e o PVP-K30 após o procedimento de secagem por aspersão. A estrutura química do PVP indica que ele pode atuar como um aceptor de prótons devido ao oxigênio da carbonila (esta banda característica foi evidenciada em aproximadamente 1670 cm^{-1}) ou do nitrogênio do anel pirrol. No entanto, por causa do efeito de impedimento estérico, o nitrogênio está impedido de participar das interações intermoleculares; por conseguinte, o grupo carbonila se torna mais suscetível à formação de pontes de hidrogênio (FRIZON et al., 2013).

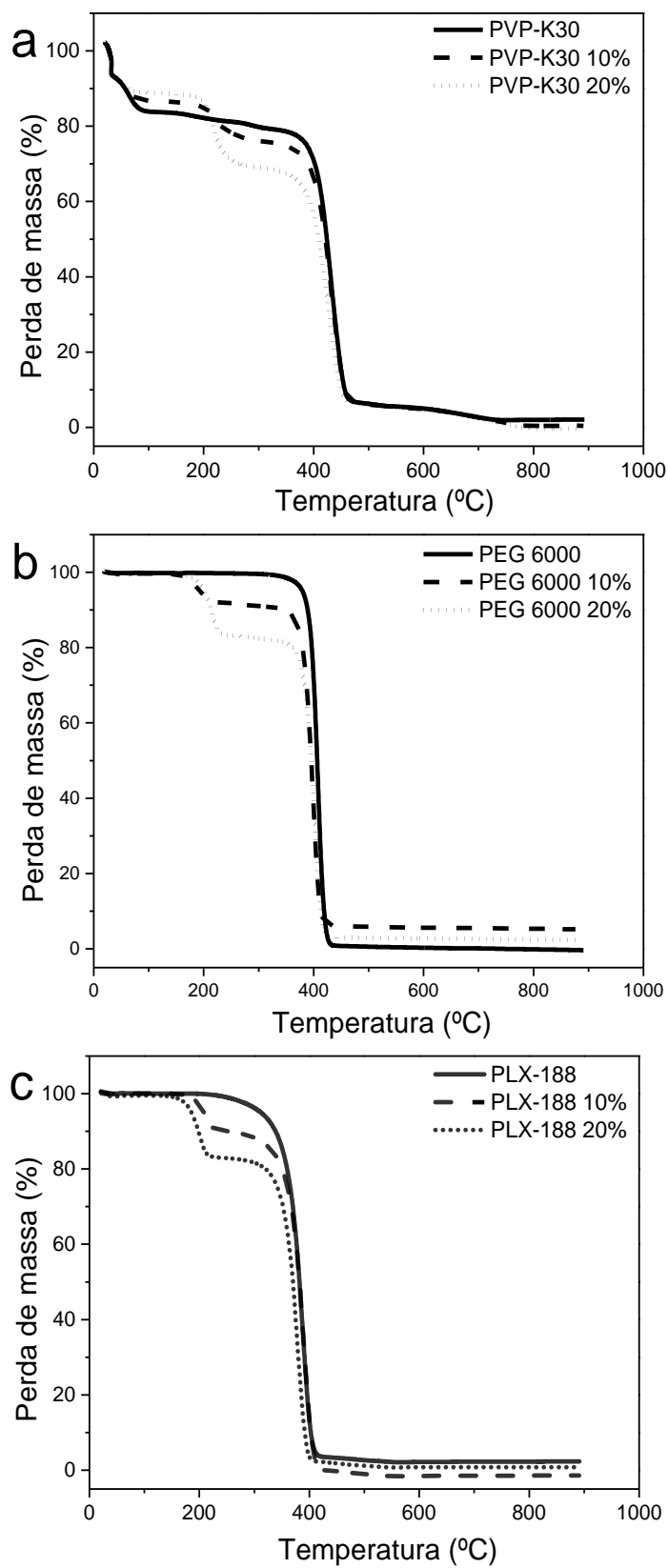
As dispersões sólidas produzidas a partir do PEG 6000 e do PLX-188 foram semelhantes às suas respectivas misturas físicas. Portanto, é possível estabelecer que nenhuma interação química entre o fármaco e o polímero foi formada durante o processo de secagem por aspersão. No entanto, devido ao baixo teor de fármaco na dispersão sólida (10 e 20%, p/p), a sua detecção pode ter sido comprometida na avaliação por IVTF (GUEDES et al., 2011).

Em geral, a intensidade da interação fármaco-polímero é maior para o PVP-K30 e inferior para o PEG 6000 e o PLX-188. Este resultado está de acordo com a amorfização detectada a partir da difração de raios X das dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão. As formulações de PVP-K30 revelaram ausência de cristalinidade, enquanto que um comportamento cristalino parcial foi verificado para as formulações de PEG 6000 e de PLX-188. Assim, confirma-se que o grau de interação fármaco-polímero pode interferir com o grau de amorfização da dispersão sólida durante o processo de obtenção tal como foi previamente reportado (CHAN et al., 2015).

5.3.8 Análise Termogravimétrica (ATG)

As curvas de ATG obtidas para os polímeros de partida e para as dispersões sólidas do sistema S3 estão representadas na Figura 38. O PVP-K30 apresentou dois eventos de perda de massa enquanto que o PEG 6000 e o PLX-188 apresentaram apenas um evento de decomposição térmica. As formulações PVP-K30 10% e PVP-K30 20% apresentaram três eventos de degradação térmica, sendo uma primeira fase intensa de perda de massa, associada à perda de água e a segunda e a terceira fase atribuídas a uma combinação da degradação da cadeia polimérica e do fármaco e da volatilização dos seus produtos de decomposição, respectivamente. As formulações PEG 6000 10%, PEG 6000 20%, PLX-188 10% e PLX-188 20% exibiram dois estágios de decomposição térmica com perfis de comportamento térmico semelhante ao observado para as formulações contendo PVP-K30, no entanto não foi detectada a fase inicial relacionada à perda de água. Além disso, os termogramas indicaram que a temperatura de início da decomposição térmica de todas as formulações estava acima de 140 °C (PVP-K30 10% = 153,8 °C; PVP-K30 20% = 144,6 °C; PEG 6000 10% = 172,4 °C; PEG 6000 20% = 153,7 °C; PLX-188 10% = 174,2 °C; PLX-188 20% = 152,1 °C), sob fluxo de N₂, o que denota que as dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão apresentaram uma estabilidade térmica adequada.

FIGURA 38 – CURVAS DE ATG DAS DISPERSÕES SÓLIDAS PREPARADAS POR SECAGEM POR ASPERSÃO DO SISTEMA S3: PVP-K30 (a), PEG 6000 (b) E PLX-188 (c)



FONTE: O autor (2016).

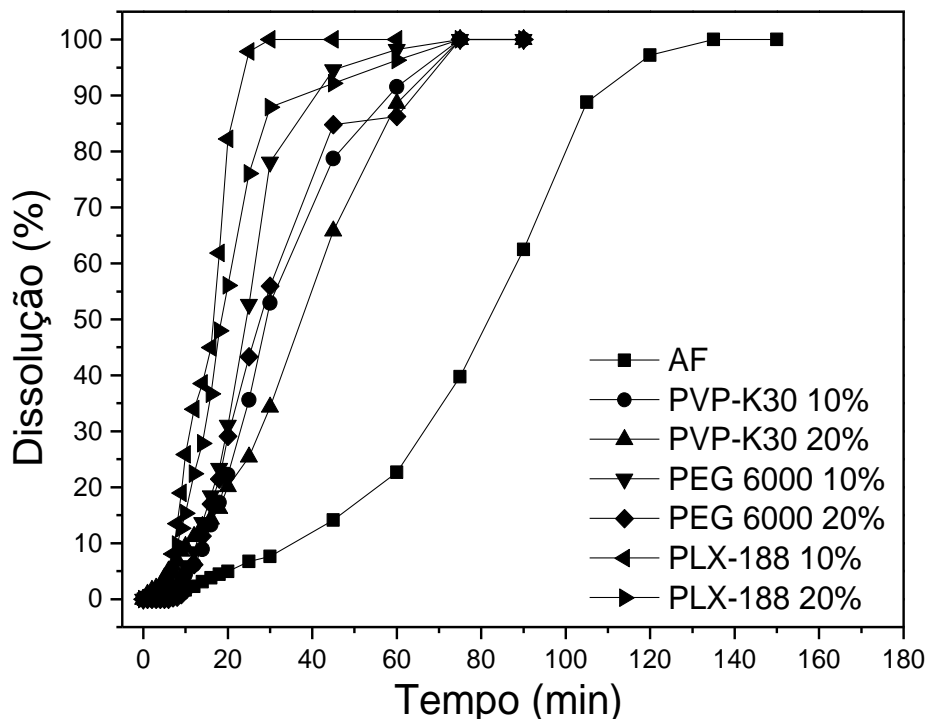
5.3.9 Estudo de Liberação *In Vitro*

O comportamento de dissolução *in vitro* de dispersões sólidas permanece como um desafio altamente individualizado. Entretanto, o desenvolvimento racional de dispersões sólidas com desempenho *in vitro* e adequada performance *in vivo* é muito desejável na indústria farmacêutica (CHEN et al., 2015).

Geralmente, as dispersões sólidas representam uma técnica farmacêutica útil para aumentar a dissolução de fármacos em formas farmacêuticas. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o aumento da cinética de dissolução de fármacos a partir de dispersões sólidas (KALIA; KHURANA; BEDI, 2009). Resumidamente, três diferentes situações podem proporcionar a dissolução do fármaco a partir de dispersões sólidas, (A) as partículas dissolvem-se rapidamente e liberam o fármaco numa solução altamente supersaturada; na sequência, as partículas de fármaco precipitam sob a forma amorfa e/ou cristalina sobre, sendo que o polímero adsorve como um estabilizador; (B) o fármaco e o polímero são liberados gradualmente, enquanto o fármaco permanece amorfo nas partículas não dissolvidas; e (C) o polímero e o fármaco são liberados gradualmente, mas o fármaco está presente na forma de cristais nas partículas não dissolvidas, especialmente na região próxima à superfície. A concentração de fármaco livre é dependente da solubilidade do fármaco, quer amorfo ou cristalino, que por sua vez depende da relação fármaco/polímero, da taxa de dissolução do polímero e a da cristalização do fármaco (HUANG & DAI, 2014). Frente ao exposto, o ensaio de dissolução *in vitro* é de extrema relevância para indicar a formulação mais apropriada para posteriores ensaios *in vivo*.

Os perfis de dissolução do fármaco puro e das dispersões sólidas obtidas a partir do PVP-K30, PEG 6000 e PLX-188 em tampão fosfato pH = 7,0 (50 mM) são comparados na Figura 39. Quando da avaliação do fármaco puro, uma liberação de 80% foi obtida em 98,0 min. Entretanto, as dispersões sólidas demonstraram tempos médios de dissolução de 46,50 min (PVP-K30 10%), 54,33 min (PVP-K30 20%), 31,72 min (PEG 6000 10%), 42,51 min (PEG 6000 20%), 19,78 min (PLX -188 10%) e 26,67 min (PLX-188 20%) para a dissolução de 80% do fármaco.

FIGURA 39 – PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO FÁRMACO PURO E DAS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3



FONTE: O autor (2016).

As dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão desempenharam um papel importante no aumento da taxa de dissolução do AF. As explicações possíveis para os efeitos observados incluem a melhora na molhabilidade do fármaco no meio de dissolução, devido à diminuição da tensão superficial dos polímeros e a conversão do fármaco do estado cristalino para o amorfo (como indicado pelos resultados de difração de raios X) (FRIZON et al., 2013). Estes dados sugerem que estas formulações obtidas por secagem por aspersão podem ser utilizadas como um veículo para a liberação imediata de fármacos por via oral.

Em relação à eficiência de dissolução (ED), um valor de ED de 48,59% foi calculado para o AF puro após 150 min, enquanto que as dispersões sólidas apresentaram valores de 77,98% (PVP-K30 10%), 75,11% (PVP-K30 20%), 82,96% (PEG 6000 10%), 78,72% (PEG 6000 20%), 89,78% (PLX-188 10%) e 85,71% (PLX-188 20%) no mesmo período de tempo. Trabalhos anteriores relatam que valores

elevados de eficiência de dissolução são verificados para formas farmacêuticas de liberação imediata, enquanto que valores mais baixos são indicativos de um comportamento de liberação controlada (MENDES et al., 2012; RAFFIN et al., 2006). Dessa forma, as dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão acarretaram em um aumento do valor da eficiência de dissolução do ácido ferúlico, o que é característico de formas farmacêuticas de liberação imediata.

De modo a comparar a porcentagem dissolvida entre as formulações em cada intervalo de tempo, o teste ANOVA *one-way* foi usado com o teste de Tukey *post hoc* (RUIZ & VOLONTÉ, 2014). Esta análise indicou uma diferença estatisticamente significativa entre o AF puro e todas as formulações: PVP-K30 10% ($p = 0,0389$), PVP-K30 20% ($p = 0,0396$), PEG 6000 10% ($p = 0,0223$), PEG 6000 20% ($p = 0,0434$), PLX-188 10% ($p = 0,0006$) e PLX-188 20% ($p = 0,0028$). No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada quando as formulações foram comparadas aos pares. Assim, a natureza do polímero (PVP-K30, PEG 6000 e PLX-188) e a concentração do fármaco (10 e 20%, p/p) são consideradas fatores críticos e determinantes no que diz respeito ao aumento da velocidade de dissolução do AF, no entanto nenhum efeito significativo foi registado quando foram realizadas alterações nas formulações obtidas. Estes dados de dissolução *in vitro* são fortemente influenciadas por vários parâmetros relacionados com as matérias-primas e com as dispersões sólidas que, em conjunto resultaram em um aumento na dissolução destas formulações como o tamanho de partícula, a área de superfície, a tensão superficial, a taxa de dissolução do fármaco, a cristalinidade final, a taxa de cristalização do fármaco, a supersaturação do fármaco em presença de um polímero, a interação fármaco-polímero, a interação fármaco-polímero-água, a solubilidade do polímero, a cinética de dissolução do polímero, entre outros (CHEN et al., 2015; HUANG & DAI, 2014; FRIZON et al., 2013).

Os perfis de liberação foram ajustados aos modelos matemáticos e a seleção do melhor modelo foi realizada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (r) e para o critério de seleção do modelo (MSC). Ainda assim, foi analisada a coerência dos valores encontrados para as constantes cinéticas de liberação e o ajuste gráfico verificado para cada equação e os resultados estão demonstrados na Tabela 19. O perfil de liberação do AF puro revelou um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo biexponencial enquanto que as dispersões sólidas foram mais bem ajustadas à equação de Weibull, em relação aos

outros modelos matemáticos avaliados. Esses resultados demonstraram que as dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão modificaram o perfil de dissolução do AF. O comportamento de liberação do fármaco puro tem sua descrição orientada por duas constantes de liberação, a α ou constante cinética da etapa rápida de liberação e a β , constante cinética verificada na etapa lenta de liberação (PENG et al., 2010), no entanto as formulações apresentaram cinética adequada ao modelo de Weibull.

TABELA 19 – RESULTADOS DA MODELAGEM MATEMÁTICA PELA EQUAÇÃO BIEXPONENCIAL PARA O ÁCIDO FERÚLICO PURO E PELA EQUAÇÃO DE WEIBULL PARA AS DISPERSÕES SÓLIDAS DO SISTEMA S3

Materiais	MSC	R	α (min⁻¹)	β (min⁻¹)	B
Ácido ferúlico	2,57	0,9747	0,0281	0,0279	—
PVP-K30 10%	6,48	0,9995	—	—	5,0731
PVP-K30 20%	3,56	0,9913	—	—	3,1441
PEG 6000 10%	5,18	0,9981	—	—	9,3931
PEG 6000 20%	5,40	0,9983	—	—	3,1204
PLX-188 10%	3,45	0,9894	—	—	6,8474
PLX-188 20%	5,37	0,9983	—	—	5,0610

A distribuição de Weibull é amplamente utilizada para ajustar os perfis de dissolução de comprimidos e pode descrever a curva de dissolução em termos de parâmetros aplicáveis. O parâmetro (b) caracteriza a curva como sendo exponencial ($b = 1$), em forma de S com curvatura ascendente, seguido de um ponto de viragem ($b > 1$), ou com um declive inicial mais íngreme do que o observado no exponencial ($b < 1$) (PATEL et al., 2008). O parâmetro Weibull b calculado foi > 1 para todas as formulações (Tabela 19), o que indica um mecanismo de liberação complexo com uma curva em forma de S com curvatura ascendente, seguido de um ponto de viragem. Quando avaliados em conjunto, o ensaio de dissolução *in vitro* e os

métodos modelo-dependentes sugerem que a liberação do AF a partir das formulações desenvolvidas por secagem por aspersão é mais rápido e com base em um mecanismo diferente ao do fármaco puro.

A fim de investigar o potencial antioxidante *in vitro* e o efeito antiplaquetário *in vivo* das dispersões sólidas contendo AF, a formulação PEG 6000 10% foi selecionada uma vez que apresentou um aspecto de pó adequado, o melhor rendimento, baixo conteúdo de água, alto teor de fármaco, baixa cristalinidade, interação fármaco-polímero reduzida, e um padrão de liberação imediata. As formulações de PVP-K30 apresentaram alto teor de água, enquanto que as dispersões sólidas de PLX-188 mostraram várias desvantagens como baixo teor de fármaco e cristais de ácido ferúlico na superfície.

5.3.10 Estudo do Potencial Antioxidante

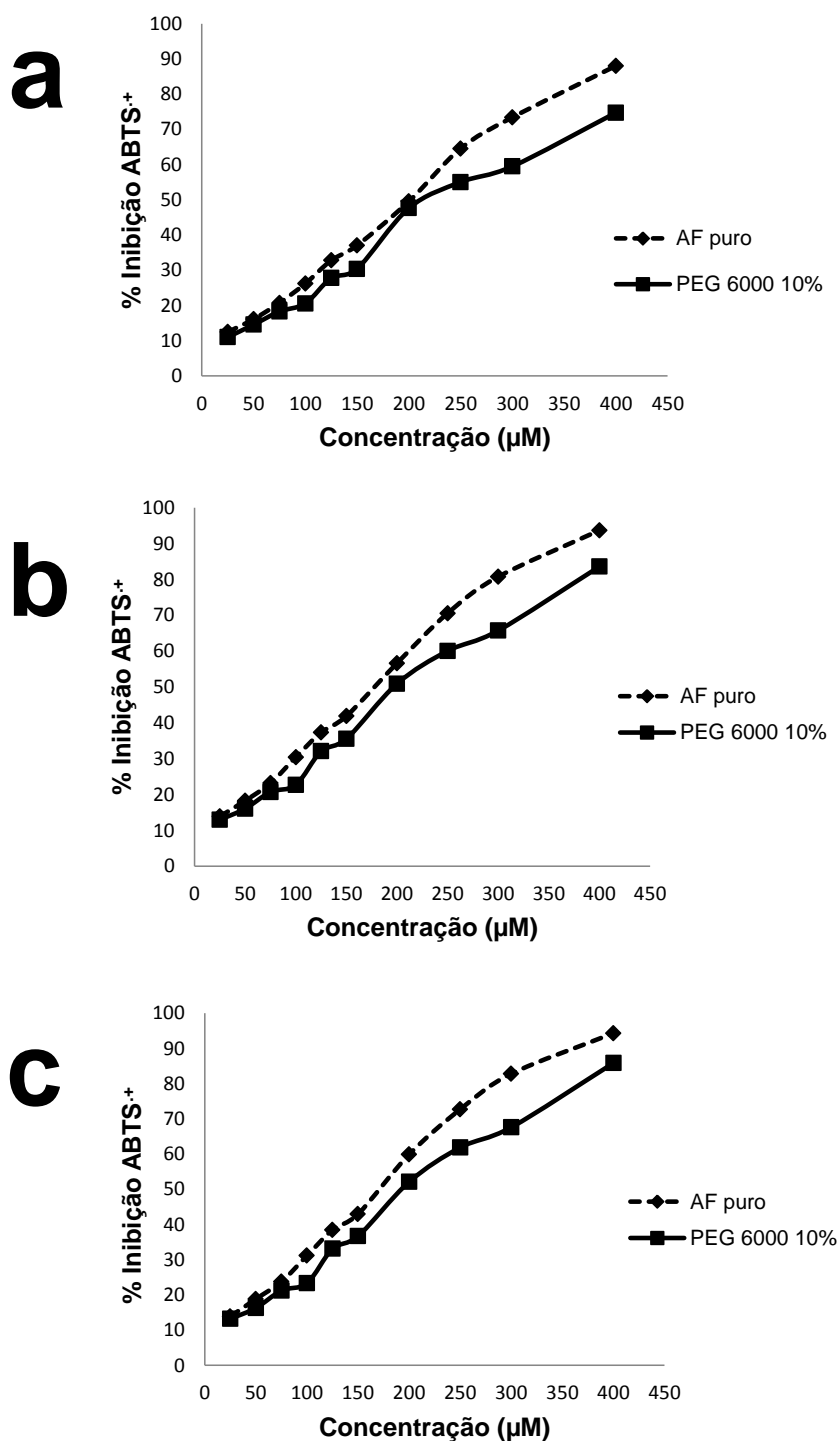
A fim de verificar a influência do procedimento de secagem por aspersão na capacidade antioxidante das dispersões sólidas obtidas, o ensaio de descoloração do radical catiônico ABTS^{•+} foi conduzido para o AF puro e para a formulação PEG 6000 10% comparando as mesmas concentrações de fármaco e intervalos de tempo. Este ensaio é amplamente utilizado para triagem das propriedades antioxidantes de diferentes compostos, e reflete a capacidade da molécula em doar elétrons ou hidrogênio para inativar o radical (MENDES et al., 2012).

Os resultados do teste de descoloração do ABTS^{•+} estão mostrados na Figura 40. Considerando a inibição do ABTS^{•+}, a formulação PEG 6000 10% revelou uma maior porcentagem de inibição com o aumento das concentrações em todos os intervalos de tempo investigados (0, 30 e 60 min). Este comportamento foi bastante semelhante ao observado para o AF puro, que indicaram que o potencial antioxidante foi mantido mesmo após o procedimento de secagem por aspersão para a dispersão sólida preparada.

A secagem por aspersão minimiza a transferência de calor e pode ser utilizada para todo o produto que apresente um comportamento semelhante a um líquido. Este procedimento fornece uma remoção rápida da água e é amplamente conhecido por assegurar a estabilidade de produtos sensíveis ao calor como, por exemplo, os antioxidantes (WILKOWSKA et al., 2016). Assim, é possível sugerir que as dispersões sólidas obtidas por secagem por aspersão são formulações de baixo

custo, de fácil transposição de escala e que demonstram um efeito antioxidante apropriado para o AF.

FIGURA 40 – EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FERÚLICO PURO E DA DISPERSÃO SÓLIDA PEG 6000 10% PELA DESCOLORAÇÃO DO RADICAL CATIÔNICO $ABTS^{\bullet+}$: a) $t = 0$ min, b) $t = 30$ min E c) $t = 60$ min



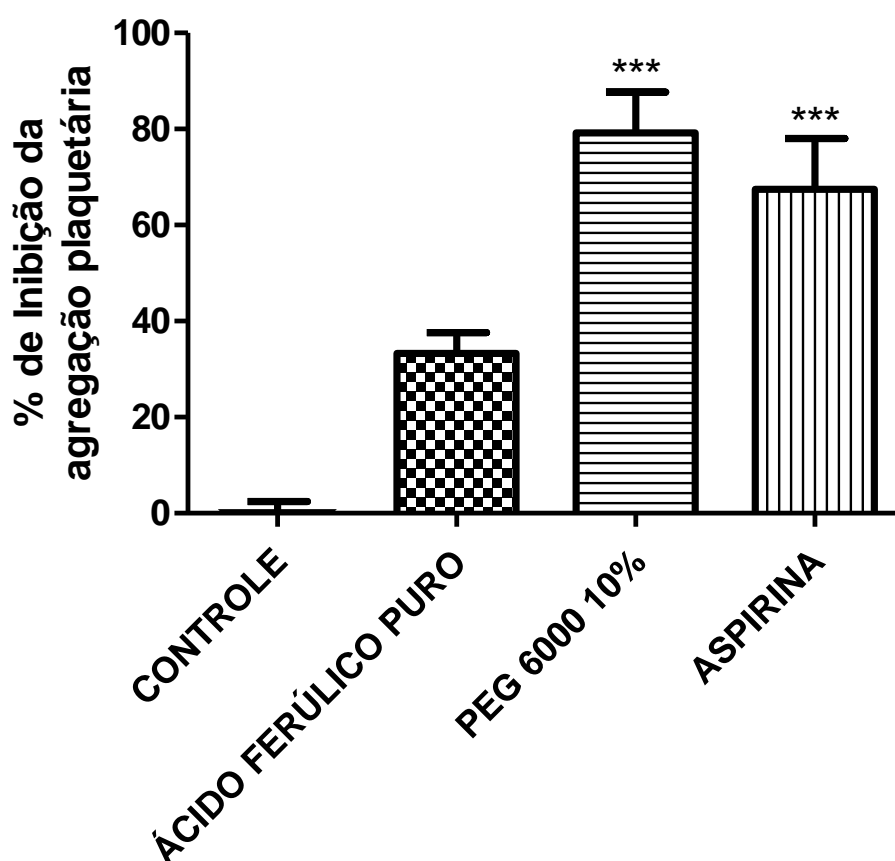
FONTE: O autor (2016).

5.3.11 Ensaio *In Vivo* da Atividade Antiagregante Plaquetária

Substâncias com propriedades antiplaquetárias são usadas como fármacos convencionais de primeira linha para a prevenção e a cura de doenças tromboarteriais (STEINHUBL; BERGER; MANN III, 2002). O AF e os seus derivados são bem conhecidos como agentes antiplaquetários porque eles podem ativar a circulação do sangue para dissipar a estase sanguínea (ZHANG et al., 2015). Este ensaio analisou o efeito *in vivo* da formulação PEG 6000 10% na inibição da agregação plaquetária estimulada por colágeno que foi realizada após 1 h da administração da última dose, a fim de investigar se esta dispersão sólida é capaz de abreviar o efeito anti-plaquetário do AF.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 41. A dispersão sólida preparada por secagem por aspersão sem a adição do fármaco foi utilizada como controle e não promoveu a inibição da agregação plaquetária. A formulação PEG 6000 10% e a aspirina apresentaram um efeito anti-plaquetário estatisticamente significativo em relação ao controle e ao AF puro. No entanto, o AF puro não teve nenhum efeito significativo sobre a inibição da agregação de plaquetas comparado com o controle. Estes dados confirmam que o processo de secagem por aspersão no desenvolvimento de dispersões sólidas promove uma melhora no efeito terapêutico do AF no que diz respeito à inibição da agregação plaquetária. Além disso, a formulação PEG 6000 10% conduziu a um resultado semelhante ao da aspirina, que é o fármaco anti-plaquetário considerado como padrão ouro (SCHRÖR, 1997). Além disso, este desempenho não foi atingido pelo AF puro no mesmo intervalo de tempo avaliado. Em resumo, estes resultados demonstram que as dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão contendo AF podem proporcionar um efeito anti-plaquetário imediato *in vivo* e, portanto, podem ser mais estudadas como um novo sistema polimérico para tratar eventos trombóticos arteriais.

FIGURA 41 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DA FORMULAÇÃO PEG 6000 0% (CONTROLE), DO ÁCIDO FERÚLICO PURO, DA FORMULAÇÃO PEG 6000 10% E DA ASPIRINA. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA A PARTIR DE 8 EXPERIÊNCIAS INDEPENDENTES. OS ASTERISCOS INDICAM NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA EM RELAÇÃO AO CONTROLE: SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, *** $p < 0,001$, TESTE DE BONFERRONI



FONTE: O autor (2016).

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, três diferentes sistemas poliméricos, a saber: (1) micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico, obtidas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente orgânico, a partir dos polímeros poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) ou poli- ϵ -caprolactona (PCL), (2) micropartículas poliméricas contendo ácido ferúlico, preparadas pelo método de secagem por aspersão, a partir do polímero metacrílico Eudragit[®] L100, e (3) dispersões sólidas contendo ácido ferúlico formuladas pelo método de secagem por aspersão, foram obtidos com sucesso.

As micropartículas de PHBV e de PCL, preparadas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico (sistema S1), foram utilizadas para o desenvolvimento e validação de um método simples e eficiente de CLAE para a determinação quantitativa do AF em micropartículas poliméricas. O método desenvolvido foi específico, linear, preciso, exato e robusto para uma rápida determinação do fármaco e pode ser utilizado para estudos da estabilidade e da cinética de degradação do AF.

Os produtos formulados pelo método de secagem por aspersão (sistema S2) com o polímero Eudragit[®] L100 resultaram em micropartículas com valores elevados de eficiência de encapsulação, morfologia e tamanho micrométrico adequado à administração prolongada por via oral, estabilidade térmica e características amorfas/não-cristalinas. O processo de microencapsulação resultou em uma interação intermolecular $O-H \cdots O=C$ entre o AF e o Eudragit[®] L100 após o procedimento de secagem por aspersão evidenciado por IVTF. As micropartículas preparadas a partir do Eudragit[®] L100 proporcionaram uma diminuição substancial na taxa de dissolução do AF, sem alterar o modelo monoexponencial de liberação. Além disso, a microencapsulação do AF demonstrou um efeito citoprotetor contra o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 e inibiu a agregação plaquetária estimulada por colágeno. Portanto, estas formulações são veículos viáveis para a liberação controlada do AF e podem ser usadas como um sistema polimérico inovador para uso oral destinados aos efeitos antioxidante, citoprotetor e antitrombótico.

As dispersões sólidas contendo AF obtidas pelo método de secagem por aspersão (sistema S3), foram desenvolvidas a partir de três diferentes carreadores

poliméricos: PVP-K30, PEG 6000 e PLX-188. As formulações de PEG 6000 apresentaram um rendimento adequado, baixo teor de água, alto teor de fármaco, reduzida cristalinidade e menor interação fármaco-polímero. No entanto, as formulações de PVP-K30 apresentaram alto teor de água, enquanto que as dispersões sólidas de PLX-188 tiveram várias desvantagens como o baixo conteúdo de fármaco e a presença de cristais de AF na superfície. Todas as formulações aumentaram a solubilidade relativa e a velocidade de dissolução do AF. A formulação PEG 6000 10% selecionada demonstrou uma atividade antioxidante *in vitro* apropriada e um efeito antiplaquetário *in vivo* estatisticamente significativo em relação ao grupo controle e ao AF puro. Estes resultados demonstram que as dispersões sólidas preparadas por secagem por aspersão contendo AF podem proporcionar um efeito anti-plaquetário imediato *in vivo* sendo, portanto, uma alternativa atrativa para o tratamento de eventos trombóticos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.
- AHMAD, M.; MADNI, A.; USMAN, M.; MUNIR, A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 75, p. 384-387, 2011.
- AL-HAMIDI, H.; EDWARDS, A. A.; MOHAMMAD, M. A.; NOKHODCHI, A. To enhance dissolution rate of poorly water-soluble drugs: Glucosamine hydrochloride as a potential carrier in solid dispersion formulations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 170-178, 2010.
- AL-OBAIDI, H.; KE, P.; BROCCINI, S.; BUCKTOM, G. Characterization and stability of ternary solid dispersions with PVP and PHPMA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 20-27, 2011.
- ALI, W.; WILLIAMS, A. C.; RAWLINSON, C. F. Stochiometrically governed molecular interactions in drug: Poloxamer solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p. 162-168, 2010.
- ALMEIDA, H. E. P. P. J Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo Ibuprofeno. 2009, 136 f. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade) – Universidade de Lisboa, Portugal, 2009.
- AL HAUSHEY, L.; BOLZINGER, M. A.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; BRIANCON, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 16-25, 2007.
- AMASS, W.; AMASS, A. E.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymer and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 47, p. 89-144, 1998.
- ANDRADE, T. C. Estudo da granulação por solidificação de materiais fundidos em leite fluidizado utilizando dispersão sólida de indometacina. 2009, 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Ribeirão Preto, 2009
- ANSELM, C.; CENTINI, M.; RICCI, M.; BUONOCORE, A.; GRANATA, P.; TSUNO, T.; FACINO, R. M. Analytical characterization of a ferulic acid/gama-cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 875-881, 2006.
- ANSELM, C.; CENTINI, M.; MAGGIORE, M.; GAGGELLI, N.; ANDREASSI, M.; BUONOCORE, A.; BERETTA, G.; FACINO, R. M. Non-covalent inclusion of ferulic

acid with alfa-cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 645-652, 2008.

BARBOZA, F. M.; MACHADO, W. M.; OLCANHESKI, L. R. J.; DE PAULA, J. P.; ZAWADZKI, S. F.; FERNANDES, D.; FARAGO, P. V. PCL/PHBV Microparticles as innovative carriers for oral controlled release of manidipine dihydrochloride. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

BERRIDGE, M. V. & TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.303, p. 474–482, 1993.

BHISE, S. D. Ternary solid dispersions of fenofibrate with poloxamer 188 and TPGS for enhancement of solubility and bioavailability. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.2(2), p.583–595, 2011.

BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. **Microparticle drug delivery systems**. In: BROWN, D.M. (ed.) Drug delivery systems in cancer therapy. Totowa: Humana Press, p. 117-135, 2003.

BIRNBAUM, D. T.; KOSMALA, J. D.; HENTHORN, D. B.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of b-estradiol from PLGA microparticles: the effect of organic solvent on encapsulation and release. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 375-387, 2000.

BLEY, H.; FUSSNEGGER, B.; BODMEIER, R. Characterization and stability of solid dispersions based on PEG/polymer blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 165-173, 2010.

BLESSY M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4(3), p. 159–165, 2014.

BOGDANOVA, S.; PAJEVA, I.; NIKOLOVA, P.; TSAKOVSKA, I.; MÜLLER, B. Interactions of Poly(vinylpyrrolidone) with Ibuprofen and Naproxen: Experimental and Modeling Studie. **Pharmaceutical Research**, v. 22(5), p. 806–815, 2005.

BONINI, M. G.; ROTA, C.; TOMASI, A.; MASON, R. P. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy?. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, p. 968–975, 2006.

BOSQUILLON, C.; ROUXHET P. G.; AHIMOU, F.; SIMON, D.; CULOT, C.; PRÉAT, V.; VANBEVER, R. Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 357-367, 2004.

BRENNER, S.; GULDEN, M.; MASER, E.; SEIBERT, H. Lasting effect of preceding culture conditions on the susceptibility of C6 cells to peroxide-induced oxidative stress. **Toxicology In Vitro**, v.24, p. 2090–2096, 2010.

CALLAHAN, J. C.; CLEARY, G. W.; ELEFANT, M.; KAPLAN, G.; KENSLER, T.; NASH, R. A. Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.8, p. 355–369, 1982.

CANEVAROLO JR., S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.

CHAKRAPANI, A. **Processing and characterization of polymer microparticles for controlled drug delivery systems**, 92 p. Doutorado em Filosofia, The Ohio State University, Columbus, 2006.

CHAN, S-Y.; CHUNG, Y-Y.; CHEAH, X-Z.; TAN, E. Y-L.; QUAH, J. The characterization and dissolution performances of spray dried solid dispersion of ketoprofen in hydrophilic carriers. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 372–385, 2015.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2434-2446, 2009.

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 2, p. 191-201, 2002.

CHEN, Y.; LIU, C.; CHEN, Z.; SU, C.; HAGEMAN, M.; HUSSAIN, M.; HASKELL, R.; STEFANSKI, K.; QIAN, F. Drug–polymer–water interaction and its implication for the dissolution performance of amorphous solid dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, v.12, p. 576–589, 2015.

CHEN, Y.; ZHANG, G. G.; NEILLY, J. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing Pluronic F-68. **International Journal of Pharmaceutics**, v.286, p. 69-80, 2004.

CHEN, Y.; ZHANG, G. G.; NEILLY, J.; MARSH, K.; MAWHINNEY, D.; SANZGIRI, Y. D. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing pluronic F-68. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 286, p. 69–80, 2004.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p.1-9, 2007

DAHLBERG, C.; MILLQVIST-FUREBY, A.; SCHULEIT, M. Surface composition and contact angle relationships for differently prepared solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 478-485, 2008.

DHILLON, B.; GOYAL, N. K.; MALVIYA, R.; SHARMA, P. K. Poorly water soluble drugs: change in solubility for improved dissolution characteristics: A review. **Global Journal of Pharmacology**, v. 8(1), p. 26–35, 2014.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DEASY, P. B. **Microencapsulation and related drug processes**. New York: Marcel Dekker, 1984.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; ALMEIDA, M. A.; NAKASHIMA, T.; De PAULA, J. F. P.; KANUNFRE, C. C.; FARAGO, P. V. Essential oil from *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambag reduces nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced murine peritoneal macrophages. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31(4), p. 545–548, 2012.

DUARTE, M. A. T.; HUGEN, R. G.; MARTINS, E. S.; PEZZIN, A. P. T.; PEZZIN, S. H. Thermal and mechanical behavior of injection molded poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) blends. **Materials Research**, v. 9, n. 1, p. 25-27, 2006.

DU, N.; CAO, S.; YU, Y. Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1697-1703, 2011.

ESPOSITO, E.; RONCARATI, R.; CORTESI, R.; CERVELLATI, F.; NASTRUZZI, C. Production of Eudragit microparticles by spray drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.5, n.2, p.267-278, 2000.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos**. 345 p. Livro-docência em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

FARAGO, P. V.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; ZAWADZKI, S. F. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1298-1305, 2008.

FRIZON, F.; ELOY, J. O.; DONADUZZI, C. M.; MITSUI, M. L.; MARCHETTI, J. M. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods. **Powder Technology**, v. 235, p. 532–539, 2013.

GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology**, v.197, p. 211-217, 2010.

GELLER, D. A. & BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.17, p. 7–23, 1998.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40(9), p. 107–1121, 2007.

GHOSH, S. K. **Functional coatings by polymer microencapsulation**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 197-201, 2002.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: An overview. **Société française des sciences et techniques pharmaceutiques**, v. 5, p. 276-290, 1995.

GOSH, I.; SNYDER, J.; VIPPAGUNTA, R.; ALVINE, M.; VAKIL, R.; TONG, W-Q. Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 12-19, 2011.

GUEDES, F. L.; DE OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z.; DE SIMONE, C. A.; VEIGA, F. J. B.; DE LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; NETO, P. J. R. Solid dispersions of imidazolidinedione by PEG and PVP polymers with potential antischistosomal activities. **AAPS PharmSciTech**, v.12(1), p. 401–410, 2011.

GULDEN, M.; JESS, A.; KAMMANN, J.; MASER, E.; SEIBERT, H. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p.1298–1305, 2010.

HESLINGA, M. J.; MASTRIA, E. M.; ENIOLA-ADEFESO, O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 138, p. 235-242, 2009.

HUANG, Y. & DAI, W-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.4(1), p. 18–25, 2014.

HUGHEY, J. R.; KEEN, J. M.; BROUGH, C.; SAEGER, S.; MCGINITY, J. W. Thermal processing of a poorly water-soluble drug substance exhibiting a high melting point: The utility of Kinetiso IR Dispersing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 222-230, 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: Text and methodology**. Q2(R1). London: ICH, 2005 (ICH Harmonised Tripartite Guideline).

ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; NAKATA, C.; SAITO, Y.; OIKAWA, S.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. **Food Chemistry**, v. 114, p. 466-471, 2009.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JONES, M. C. & LEROUX, J. C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.48, p.101–111, 1999.

JØRGENSEN, A. C. & TORSTENSON, A. S. Humid storage conditions increase the dissolution rate of diazepam from solid dispersions prepared by melt agglomeration. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.13, p.187–195, 2008.

KABANOV, K. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v.82, p.189–212, 2002.

KALIA, A.; KHURANA, S.; BEDI, N. Formulation and evaluation of mouth dissolving tablets of oxcarbazepine. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.1(1), p.12–23, 2009.

KANAUJIA, P.; LAU, G.; NG, W. K.; WIDJAJA, E.; SCHREYER, M.; HANEFELD, A.; FISCHBACH, M.; SAAL, C.; MAIO, M.; TAN, R. B. Investigating the effect of moisture protection on solid-state stability and dissolution of fenofibrate and ketoconazole solid dispersions using PXRD, HSDSC and Raman microscopy. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.37, p.1026–1035, 2011.

KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, E.; SIGALAS, M. P.; AVGOUSTAKIS, K.; BIKIARIS, D. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 334-347, 2007.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, p. 303-309, 2003.

KIM, H. S.; LEE, K.; KANG, K. A.; LEE, N. H.; HYUN, J. W. Phloroglucinol exerts protective effects against oxidative stress-induced cell damage in SH-SY5Y cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.119, p.186–192, 2012.

KISSEL, T.; MARETSCHKE, S.; PACKHAUSER, C.; SCHNIEDERS, J.; SEIDEL, N. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. (ed.). **Microencapsulation: Methods and industrial applications**. Boca Raton: Taylor & Francis Group v. 158, p. 99-122, 2006.

KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

LEUNER, C. & DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p. 47–60, 2000.

LI, F-Q.; HU, J-H.; DENG, J-X.; SU, H.; XU, S.; LIU, J-Y. In vitro controlled of sodium ferulate from Compritol 888 ATO-based matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 152-157, 2006.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 26-39, 2008.

LI, Y. & BI, K. HPLC determination of ferulic acid in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong and its compound preparation. **Biomedical Chromatography**, v.17, p. 543–546, 2003.

LIN, D.; HUANG, Y. A thermal analysis method to predict the complete phase diagram of drug-polymer solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, p. 109-115, 2010.

LIONZO, M. I. Z. **Micropartículas de P(HBV) e blendas de P(HBV):PCL contendo dexametasona ou acetato de dexametasona como modelos de fármacos: caracterização físico-química e perfis de liberação *in vitro***. 138 p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LOPES, E. C.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v.55, n.7, p.527-530, (2000).

LU, B.; ZHANG, J. Q.; YANG, H. Lung-targeting microspheres of carboplatin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 1-11, 2003.

MAGHSOODI, M. Physicomechanical properties of naproxen-loaded microparticles prepared from Eudragit L100. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 1, p. 120-128, 2009.

MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2004.

MAINARDES, M. M. Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina. 133 p. Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MANCUSO, C. & SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p.185–195, 2014.

MAULVI, F. A.; DALWADI, S. J.; THAKKAR, V. T.; SONI, T. G.; GOHEL, M. C.; GANDHI, T. R. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. **Powder Technology**, v. 207, p. 47-54, 2011.

MENDES, J. B. E.; RIEKES, M. K.; DE OLIVEIRA, V. M.; MICHEL, M. D.; STULZER, H. K.; KHALIL, N. M.; ZAWADZKI, S. F.; MAINARDES, R. M.; FARAGO, P. V. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1–13, 2012.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 563-580, 1998.

MERLIN, J. P. J.; PRASAD, N. R.; SHIBLI, S. M. A.; SEBEELA, M. Ferulic acid loaded Poly-d,l-lactide-co-glycolide nanoparticles: Systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line in vitro. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 69-76, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

MURTAZA, G.; KHAN, S. A.; NAJAM-UL-HAQ, M.; HUSSAIN, I. Comparative evaluation of various solubility enhancement strategies for furosemide. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.27(4), p. 963–73, 2014.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.

OBEIDAT, W. M. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using the emulsion solvent removal methods. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 178-192, 2009.

OGAWA, Y.; YAMAMOTO, M.; OKADA, H.; YASHIKI, T.; SHIMAMOTO, T. A new technique to efficiently entrapment leuprolide acetate into microcapsules of polyactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 1095-1103, 1988.

OHARA, T.; KITAMURA, S.; KITAGAWA, T.; TERADA, K. Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 95–102, 2005.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R. F.; SOUZA, C. R. F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. **Drying Technology**, v.24, n.4, p.523-533, 2006.

de OLIVEIRA, H. P.; TAVARES, G. F.; NOGUEIRAS, C.; RIEUMONT, J. Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380(1-2), p. 55-61, 2009.

de OLIVEIRA, H. P.; J. J. ALBUQUERQUE Jr.; NOGUEIRAS C.; RIEUMONT J. Physical chemistry behavior of enteric polymer in drug release systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366(1-2), p.185-189, 2009.

ONEDA, F. & RÉ, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. **Powder Technology**, v.130, p.377-384, 2003.

PARADKAR, A.; AMBIKE, A. A.; JADHAV, B. K.; MAHADIK, K. R. Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271(1-2), p. 281-286, 2004.

PATEL, D. B. Comparative evaluation of different carriers to enhance solubility and dissolution of poor water soluble drug. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.5(4), p. 463–471, 2014.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, n.2, p. 299-303, 2009.

PATEL, N.; CHOTAI, N.; PATEL, J.; SONI, T.; DESAI, J.; PATEL, R. Comparison of in vitro dissolution profiles of oxcarbazepine-HP β -CD tablet formulations with marketed oxcarbazepine tablets. **Dissolution Technologies**, v. Nov, p. 28–34, 2008.
PENG, H.; XIONG, H.; LI, J.; XIE, M.; LIU, Y.; BAI, C.; CHEN, L. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v.121, p. 23–28, 2010.

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S. Micropartículas secas contendo fármaco modelo lipofílico preparadas a partir de suspensão aquosa: estudo de formulação. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.25, n.2, 198-205, 2006.

PICONE, P.; NUZZO, D.; DI CARLO, M. Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric A-beta on sea urchin embryo. **The Biological Bulletin**, v.224, p.18–28, 2013.

POLETTI, F. S.; JAGER, E.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 70-80, 2007.

RAFFIN, R. P.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Preparation, characterization, and *in vivo* anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.63(2), p.198–204, 2006.

RAFFIN, R. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; RÉ, M. I. Powder characteristics of pantoprazole delivery systems produced in different spray-dryer scales. **Drying Technology**, v.24, n.3, p.339-348, 2006.

RAO, B. P.; MATHEWS, R.; KRISHNA, K. P.; B. BABY; POORNIMA. Spray-dried gastroretentive floating microparticles: Preparation and *in vitro* evaluation. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26(4), p. 707–713, 2013.

RATTES, A. L. R. & OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v.171, n.1, p.7-14, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, p.1195-1236, 1998.

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GÖPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 339-350, 2001.

RESTANI, R. B.; CORREIA, V. G.; BONIFÁCIO, V. D. B.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 333-339, 2010.

RIEKES, M. K.; TAGLIARI, M. P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 1008-1013, 2010.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; BOHATCH, M. J.; FARAGO, P. V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 962-968, 2011.

RIZI, K.; GREEN, R. J.; DONALDSON, M.; WILLIAMS, A. C. Production of pH-responsive microparticles by spray drying: investigation of experimental parameter

effects on morphological and release properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100(2), p.566–579, 2011.

ROA, J. P. B.; MANO, V.; FAUSTINO, P. B.; FELIX, E. B.; SILVA, M. E. S. R.; SOUZA FILHO, J. D. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ϵ -caprolactona). **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

ROLEIRA, F. M.; SIQUET, C.; ORRÙ, E; GARRIDO, M.; GARRIDO, J.; MILHAZES, N.; PODDA, G.; PAIVA-MARTINS, F.; REIS, S.; CARVALHO, R. A.; SILVA, E.J.T.; BORGES, F. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 5816–5825, 2010.

ROSSI, S.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1013-1018, 2004.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. Comunicado Técnico 128. Embrapa, Fortaleza, 2007.

RUIZ, M. E. & VOLONTÉ, M. G. Biopharmaceutical relevance of dissolution profile comparison: proposal of a combined approach. **Dissolution Technologies**, v.feb, p. 32–43, 2014.

SAHOO, S.; CHAKRABORTI, C. K.; BEHERA, P. K.; MISHRA, S. C. FTIR and Raman spectroscopic investigations of a norfloxacin/carbopol934 polymeric suspension. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4(3), p.138–145, 2012.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39–47, 2000.

SAJJADI, S. E.; SHOKOOHINIA, Y.; MOAYEDI, N. S. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima* Mozaff. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v.7(4), p.159–162, 2012.

SAKURAI, A.; SAKAI, T.; SAKO, K.; MAITANI, Y. Polymer Combination Increased Both Physical Stability and Oral Absorption of Solid Dispersions Containing a Low Glass Transition Temperature Drug: Physicochemical Characterization and in vivo Study. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 60, p. 459-464, 2012.

SANTOS, A. S. Avaliação das propriedades de estado sólido de dispersões de hidroclotiazida em polivinilpirrolidona. 2008, 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, M. E. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, 2004

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

SCHRÖR, K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 23(4), p. 349–356, 1997.

SENTHILKUMAR, K. L. & SIRISHA, Y. Enhancement of dissolution rate studies on solid dispersion of aceclofenac. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2 (2), p.70–76, 2011.

SHARMA, A. & JAIN, C. P. Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with PVP K30. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.5(1), p. 49–56, 2010.

SHUKLA, A. J.; PRICE, J. C. Effect of drug (core) particle size on the dissolution of theophylline from microspheres made from low molecular weight cellulose acetate propionate. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 418-421, 1989.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SINGH, S. & DIXIT, D. A Review on spray drying: emerging technology in food industry. **International Journal of Applied Engineering and Technology**, v.4(1), p.1–8, 2014.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, V. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SONG, Y.; WU, T.; YANG, Q.; CHEN, X.; WANG, M.; WANG, Y.; PENG, X.; OU, S. Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 141–147, 2014.

SOUZA, C. R. F. & OLIVEIRA, W. P. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* Link extract. **Drying Technology**, v.24, p.735-749, 2006.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, p. 92-100, 2007.

STANIFORTH, V.; HUANG, W-C.; ARAVINDARAN, K.; YANG, N-S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 443-451, 2012.

STEINHUBL, S. R.; BERGER, P. B.; MANN III, J. T. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 288(19), p. 2411–2420, 2002.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Development of controlled release captopril granules coated with ethylcellulose and methylcellulose by fluid bed dryer. **Drug Delivery**, v.15, n. 1, p.11-18, 2008.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; PARIZE, A. L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M.C.M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 29(2), p. 387–392, 2009.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TERASHVILI, M.; SARKAR, P.; NOSTRAND, M. V.; FALCK, J. R.; HARDER, D. R. The protective effect of astrocyte-derived 14,15-epoxyeicosatrienoic acid on hydrogen peroxide-induced cell injury in astrocyte-dopaminergic neuronal cell line co-culture. **Neuroscience**, v. 223, p. 68–76, 2012.

THOMPSON, C. J.; HANSFORD, D.; HIGGINS, S.; ROSTRON, C.; HUTCHEON, G. A.; MUNDAY, D. L. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 53-61, 2007.

TRAN, T.T-D.; TRAN, P.H-L.; CHOI, H-G.; HAN, H-K.; LEE, B-J. The roles of acidifiers in solid dispersions and physical mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v.384, p. 60-66, 2010.

TRAN, V.; BENOÎTA, J. P.; VENIER-JULIENNEA, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p. 1-11, 2011.

TROMBINO, S.; CASSANO, R.; FERRARELLI, T.; BARONE, E.; PICCI, N.; MANCUSO, C. *Trans*-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.109, p. 273–279, 2013.

VAN DEN MOOTER, G.; AUGUSTIJNS, P.; BLATON N. Physicochemical characterization of solid dispersions of temazepam with polyethylene glycol 6000 and PVP K30. **International Journal of Pharmaceutics**, v.164, p. 67–80, 1998.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble. **Drug Discovery Today**, v.12(23-24), p. 1068–1075, 2007.

VASHISTH, P.; SHARMA, M.; NIKHIL, K.; SINGH, H.; PANWAR, R.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V. Antiproliferative activity of ferulic acid-encapsulated electrospun PLGA/PEO nanofibers against MCF-7 human breast carcinoma cells. **3 Biotech**, v. 5, p. 303–315, 2015.

VIPPAGUNTA, S. R.; WANG, Z.; HONUNG, S.; KRILL, S. C. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 294-304, 2007.

VYAS, V.; SANCHETI, P.; KAREKAR, P. Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, p. 453–461, 2009.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Food Chemistry**, v.124, p. 1069-1075, 2011.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WEUTS, I.; KEMPEN, D.; VERRECK, G.; DECORTE, A.; HEYMANS, K. Study of the physicochemical properties and stability of solid dispersions of loperamide and PEG 6000 prepared by spray drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.59(1), p.119-126, 2005.

WILKOWSKA, A.; AMBROZIAK, W.; CZYŻOWSKA, A.; ADAMIEC, J. Effect of microencapsulation by spray-drying and freeze-drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. **Polish Journal of Food And Nutrition Sciences**, v. 66(1), p. 0–0, 2016.

WORANUCH, S. & YOKSAN, R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 495–502, 2013.

WU, J. X.; YANG, M.; BERG, F.; PAJANDER, J.; RADES, T.; RANTANEN, J. Influence of solvent evaporation rate and formulation factors on solid dispersion physical stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 610-620, 2011.

YU, D-G.; YANG, J-M., BRANFORD-WHITE, C.; LU, P.; ZHANG, L.; ZHU, L-M. Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.400, p. 158-164, 2010.

ZAMORA, R.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. **Molecular Medicine**, v.6, p. 347–73, 2000.

ZHANG, G. S.; FENG, C.H.; JIANG W.; HU P. Y.; DENG P.; ZHANG Y.; LUO X.J. The mechanical properties and moisture permeability of eudragit L100/S100 free films affected by plasticizers and membrane materials ratio. **Yao Xue Xue Bao**, v. 46 (9), p. 1144-1149, 2011.

ZHANG, P-X.; LIN, H.; QU, C.; TANG, Y-P.; LI, N-G.; KAI, J.; SHANG, G.; LI, B.; ZHANG, L.; YAN, H.; LIU, P.; DUAN, J-A. Design, synthesis, and *in vitro* antiplatelet aggregation activities of ferulic acid derivatives. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p.1–7, 2015.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691–702, 2008.

APÊNDICE 1 - MANUSCRITO 1**A STABILITY-INDICATING HPLC-DAD METHOD FOR DETERMINATION OF FERULIC ACID INTO MICROPARTICLES: DEVELOPMENT, VALIDATION, FORCED DEGRADATION, AND ENCAPSULATION EFFICIENCY**

Artigo publicado no periódico *Journal of Analytical Methods in Chemistry*

Volume 2015, Article ID 286812, 10 pages

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/286812>

A Stability-Indicating HPLC-DAD Method for Determination of Ferulic Acid into Microparticles: Development, Validation, Forced Degradation and Encapsulation Efficiency

Jessica Mendes Nadal^a, Maria da Graça Toledo^a, Yasmine Mendes Pupo^b, Josiane Padilha de Paula^c, Paulo Vitor Farago^{*c} and Sandra Maria Warumby Zanin^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Brazil

^b Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Brazil

^c Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Brazil

*Address correspondence to this author at the State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil;
Tel: +55 42 32203115; Fax: +55 42 32203102;
E-mail: pvfarago@gmail.com

A Stability-Indicating HPLC-DAD Method for Determination of Ferulic Acid into Microparticles: Development, Validation, Forced Degradation and Encapsulation Efficiency

Abstract: A simple stability-indicating HPLC-DAD method was validated for the determination of ferulic acid (FA) in polymeric microparticles. Chromatographic conditions consisted of a RP C₁₈ column (250 mm x 4,60 mm, 5 µm, 110 Å) using a mixture of methanol and water pH 3,0 (48:52 v/v) as mobile phase at a flow rate of 1,0 mL/min with UV detection at 320 nm. The developed method was validated as per ICH guidelines with respect to specificity, linearity, limit of quantification, limit of detection, accuracy, precision and robustness provided suitable results regarding all parameters investigated. The calibration curve was linear in the concentration range of 10,0-70,0 µg/mL with a correlation coefficient > 0,999. Precision (intraday and interday) was demonstrated by a relative standard deviation lower than 2,0%, Accuracy was assessed by the recovery test of FA from polymeric microparticles (99,02% to 100,73%). Specificity showed no interference from the components of polymeric microparticles or from the degradation products derived from acidic, basic and photolytic conditions. In conclusion, the method is suitable to be applied to assay FA as bulk drug and into polymeric microparticles and can be used for studying its stability and degradation kinetics.

Keywords: Degradation Kinetics, Poly(ε-caprolactone), Poly(3-hidroxybutirate-co-3-hidroxyvalerate), Polymeric Microparticles, Stability, Validation.

1. INTRODUCTION

Ferulic acid (FA; C₁₀H₁₀O₄; M_w: 194,18 Da) or (*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid (Figure 1) is a chemical compound widely found in vegetables which has a low degree of toxicity after oral administration [1]. In nature, it is biosynthesized from phenylalanine and L-tyrosine by shikimate pathway and occurs mainly as *trans* isomer [2,3]. FA is characterized as an off-white to light yellowish brown crystalline powder that has aqueous solubility of 6,63 mg/dL at pH 7,2 [4], pK_a of 4,58, melting range between 168-171°C, half-life of 42 min [5] and log P of 1,67 [6]. In particular, FA has been proposed as a novel antioxidant drug endowed with a strong cytoprotective activity due to both the ability to scavenge free

radicals and activate cell stress response [1]. Previous studies have demonstrated that it has diverse therapeutic activity, including effects such as anti-inflammatory, antioxidant, antithrombotic, anticancer, cardioprotective and neuroprotective, When used on the skin, FA shows a photoprotective effect [7,8,9,2,10,11].

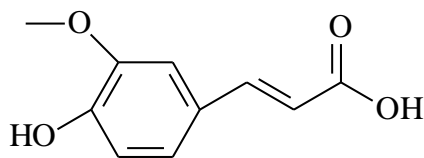


FIGURE 1: Chemical structure of ferulic acid (FA)

In spite of the remarkable pharmacological potential, FA has a poor solubility in aqueous medium [7] and presents an unfavorable pharmacokinetics which reduces its bioavailability and clinical efficacy after oral administration [12]. In order to increase FA bioavailability and enhance its cytoprotective effects, new formulations have been prepared in which this phenolic acid is entrapped either in solid lipid nanoparticles or in niosomes or is bound to other therapeutic agents through organic moieties (e.g, aminoacids) which serve as carriers [1]. However, no paper was devoted to investigate the use of polymeric microparticles as a pharmaceutical approach for improving the therapeutic efficacy of FA by prolonging its retention time into the gastrointestinal tract.

Polymeric microparticles are widely studied carriers for the controlled release application of drugs. These multiple-unit pharmaceutical dosage forms are solid and show spherically-shaped particles ranging in size from 1 to 1000 μm , in which the drug can be either adsorbed at the surface of the polymer or encapsulated within the polymer [13]. The advantages of using such carriers include: potential to increase the bioavailability of poorly water-soluble drugs, ability to control the rate and/or the site of drug release, possibility to improve drug stability related to enzymatic, environmental or chemical/photochemical degradation, elimination of incompatibilities among different drugs, and as a taste-masking approach [14,15]. Various methods are readily available for microencapsulation of drugs and one of the most commonly used is emulsion/solvent evaporation [16]. This procedure can be performed via various protocols and the selection for best option depends on the property of the compounds that are intended to be encapsulated [17]. In our laboratory, experiments are being carried out in order to formulate FA-loaded polymeric microparticles using

the simple emulsion/solvent evaporation technique and two biocompatible and biodegradable polyesters, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). However, an analytical validation procedure is required for assaying FA from these formulations at the same time.

The literature reports few HPLC methods for determining FA from different sample types as summarized in Table 1. These papers are mainly devoted to describe HPLC methods for isolation, analytical and bioanalytical quantification of FA from medicinal herbs and foods. Only two papers used HPLC method for quantifying FA from inclusion complexes that were prepared using cyclodextrins [2,18]. However, none of these two studies involving cyclodextrins was submitted to the required validation process. In that sense, it was not found works on validation of analytical methods for determining FA as bulk drug and from pharmaceutical formulations.

Table 1: Previous papers that report HPLC methods for isolation and quantification of FA

Sample type	Chromatographic conditions	Was the (bio)analytical validation process carried out?	Reference
Rat plasma after oral administration of Chuanxiong rhizome and its related preparation (Suanzaoren)	Column: Hypersil C ₁₈ column (200 x 4.6 mm, 5 μ m); Mobile phase: acetonitrile:water (16:84 v/v) containing 1% glacial acetic acid; Injection volume: 20 μ L; Flow rate: 0.8 mL/min; Column Temperature: Ambient; Detection: UV (320 nm); Retention time: 12.7 min.	Yes	Li and Bi (2003)
Ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion complex	Column: Supelcosil LC-18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m); Mobile phase: acetonitrile:water (2% acetic acid) (22:78 v/v); Injection volume: 20 μ L; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: Ambient; Detection: UV (320 nm); Retention time: 10.5 min.	No	Anselmi et al. (2006)
Rabbit plasma after intravenous administration of danxiongfang (a Chinese medicine formula used to treat atherosclerosis and	Column: Agilent HC-C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μ m); Mobile phase: methanol:water (0.5% glacial acetic acid) (20:80 to 80:20, v/v); Injection volume: 20 μ L; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: Ambient; Detection: UV (281 nm);	Yes	Li et al. (2007)

vascular restenosis)	Retention time: 7.78 min.		
Ma-Zu-Wan-Show-Yao-Jyo (a Chinese tonic wine)	Column: Cosmosil 5C ₁₈ -AR-II (250 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile phase: water adjusted to pH 3.0 with 0.1 N phosphoric acid:acetonitrile (65:35 to 75:25, v/v); Injection volume: 20 µL; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: Ambient; Detection: UV (285 nm); Retention time: 10.0 min.	Yes	Lin, Cham and Wu (2010)
Xuebijing injection (a traditional Chinese medicine for treating sepsis)	Column: Zorbox SB C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile phase: 0.2% phosphoric acid:acetonitrile in gradient elution; Injection volume: 20 µL; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: Ambient.	Yes	Chen et al. (2010)
Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Column: C ₁₈ Waters Symmetry column (150 x 3.9 mm, 5 µm) coupled to a guard column; Mobile phase: 1% (v/v) acetic acid:acetonitrile in gradient elution; Injection volume: 20 µL; Flow rate: 0.8 mL/min; Column Temperature: 30°C; Detection: UV (280 nm); Retention time: 18 min.	Yes	Vichapong et al. (2010)
Ferulic acid/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex	Column: C ₁₈ Symmetry column (150 x 3.9 mm, 5 µm); Mobile phase: methanol:water:acetic acid (50:50:0.5); Injection volume: 10 µL; Flow rate: 0.8 mL/min; Column Temperature: 30°C; Detection: UV (313 nm); Retention time: 15 min.	No	Wang et al. (2011)
Insampaedok-san (a traditional oriental medicine prescription for treating cold-related symptoms)	Column: Shiseido C ₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile phase: water with 0.1% trifluoroacetic acid: methanol in gradient elution; Injection volume: 20 µL; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: 35°C; Detection: UV (320 nm); Retention time: 22.07 min.	Yes	Weon et al. (2012)
Nao-De-Sheng (a traditional Chinese formula containing Chuanxiong rhizome)	Column: C ₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile phase: methanol:water (0.5% acetic acid) (30:70, v/v); Injection volume: 20 µL; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: 35°C; Detection: UV (320 nm); Retention time: 15.02 min.	Yes	Ouyang et al. (2012)

<i>Ferula asafoetida</i> and a polyherbal preparation	Column: HiQSil ODS C-18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m); Mobile phase: acetonitrile: 10% acetic acid (20:80 v/v), pH 2.25; Injection volume: 20 μ L; Flow rate: 1.0 mL/min; Column Temperature: 30°C; Detection: UV (319 nm); Retention time: 10.24 min.	Yes	Kareparamban et al. (2013)
---	--	-----	----------------------------

According to The International Conference on Harmonization (ICH) stability guideline [27], stress testing of a drug substance can be carried out to elucidate its inherent stability characteristics under hydrolytic, oxidative and photolytic conditions. Considering FA, to the best of our knowledge, there is no stability-indicating method previously published for this drug.

Taking all the above into account, in the current paper, a fast, simple and optimized reverse-phase HPLC method with UV detection was developed and validated for quantifying FA in polymeric microparticles. Other experiments were also performed to explore forced degradation of the drug under stress conditions as per the ICH guidelines [27, 28, 29].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and Chemicals

Ferulic acid 99.80% (FA, Suzhou Leader Chemical Co. Ltda., Suzhou, China), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (\overline{M}_w = 70000–90000 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) (\overline{M}_w = 380000 g/mol, 8.70 mol% hydroxyvalerate, Biocycle L110, PHB Industrial, Serrana, Brazil) and poly(vinyl alcohol) (PVA) (\overline{M}_w = 72000 g/mol, 88.5 mol% of hydrolysis, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used as received. As an internal standard, trans-ferulic acid, matrix substance \geq 99.0% (HPLC) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade methanol was also provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was purified in a Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). All others reagents and solvents were of analytical grade.

2.2 Equipment

A Varian Pro-star SYS-LC-240-E HPLC system (Walnut Creek, CA, USA) was used for method development. The HPLC system was equipped with a column oven compartment (model ProStar 410), an on-line degasser (model ProStar 230), a ternary pump (model ProStar 230), a solvent delivery module (model ProStar 230), an auto sampler (model ProStar 410), and a photodiode array detector (DAD) (model ProStar 335). Data acquisition, analysis, and reporting were performed using Varian Star Workstation chromatography software (Walnut Creek, CA, USA).

2.3 Chromatographic Conditions

Experiments were performed in the previously described HPLC system using a Varian C₁₈ analytical column (Walnut Creek, CA, USA) with 5 μ m particle size, 4.6 mm internal diameter and 250 mm length at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The mobile phase consisted of methanol and water adjusted to pH 3.0 with ortho-phosphoric acid 0.1 N (48:52, v/v) at an isocratic flow rate of 1.0 mL/min. The sample injection volume was 10 μ L. FA was monitored at 320 nm. The method run time was 8 minutes and all experiments were carried out in triplicate.

2.4 Preparation of polymeric microparticles

The polyester microparticles containing FA were prepared by simple emulsion/solvent evaporation [30]. Three different formulations (Table 2) were obtained for each polymer (PHBV/PCL) depending on the amount of FA into their compositions (5, 10 and 20%). Chloroform and methylene chloride were used as polymer solvent for PHBV and PCL, respectively. Briefly, the organic phase was added into the aqueous phase under mechanical stirring (5000 rev/min) for 5 min. The emulsion was kept under mechanical stirring (800 rev/min) at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) for 4 h. After organic solvent evaporation, microparticles were separated by centrifugation (2500 rev/min, 10 min), washed twice with purified water and dried under vacuum at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 4 h. The samples were stored into a desiccator under vacuum at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). All formulations were obtained in triplicate. Unloaded-microparticles were also prepared as negative controls (M1FA0 and M2FA0). All procedures were performed in dark conditions.

Table 2: Composition of ferulic acid-loaded and unloaded PHBV/PCL microparticles

Composition	Formulation							
	M1FA0	M1FA5	M1FA10	M1FA20	M2FA0	M2FA5	M2FA10	M2FA20
Aqueous phase								
Polysorbate 80 (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
PVA (g)	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Purified water (mL)	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Organic phase								
Ferulic Acid (g)	—	0.10	0.20	0.40	—	0.10	0.20	0.40
PHBV (system M1) (g)	2.00	1.90	1.80	1.60	—	—	—	—
PCL (system M2) (g)	—	—	—	—	2.00	1.90	1.80	1.60
Chloroform (mL)	40.0	40.0	40.0	40.0	—	—	—	—
Methylene chloride (mL)	—	—	—	—	40.0	40.0	40.0	40.0

2.5 Preparation of standard solutions

A stock standard solution (1 mg/mL) was daily prepared by dissolving 50 mg of FA into a 50 mL volumetric flask using methanol. This solution was further diluted in methanol to prepare seven different working standard solutions ranging from 10.0 to 70.0 µg/mL. These solutions were filtered through a poly(vinylidene fluoride) membrane filter (Durapore membrane, 0.45 µm pore size, Millipore, Bedford, MA, USA) before injection into the HPLC system. All procedure was carried out in dark conditions.

2.6 Preparation of sample solutions

For FA quantification, the amount of drug into FA-loaded PHBV/PCL microparticles was indirectly determined. As previously described, microparticles were centrifuged at 2500 rev/min for 10 minutes and washed twice with purified water after organic solvent evaporation. Free FA was assayed in the supernatant after its suitable dilution and filtration through a 0.45 µm poly(vinylidene fluoride) membrane filter by injection into the HPLC system.

2.7 Method development

Detection wavelength for the HPLC study was selected as 320 nm. The chromatographic conditions were optimized for resolution of the peak of FA by

varying the composition and proportion of the mobile phase. Samples of different formulations were used to optimize the chromatographic conditions for resolving FA. An appropriate blank was injected before the analysis of all samples. The method was then validated and used for the determination of FA into PHBV/PCL microparticles.

2.8 Method Validation

Validation studies were performed using the optimized chromatographic conditions based on the principles of validation described in the International Conference Harmonization (ICH) guidelines [29]. The method was validated for specificity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy, precision and robustness.

The specificity was determined by analyzing the chromatograms of unloaded microparticles (M1FA0 and M2FA0) in comparison with those obtained for FA-loaded microparticles (M1FA10 and M2FA10) aiming at confirming that none of the excipients interfere with the quantitation of the drug.

The linearity was determined by calculating a regression line from the plot of the peak area vs. concentration of the working standard solutions prepared at seven concentration levels (10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, and 70.0 $\mu\text{g/mL}$) using least-squares linear regression analysis. The linearity test was performed for 3 consecutive days in the same concentration range. The solutions were injected in triplicate into the HPLC column keeping the injection volume constant (10 μL) and chromatograms were recorded. The standard deviation (SD) value for the slope and Y-intercept of the calibration curve were calculated.

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the response (δ) and the slope (S) of the calibration curve and were expressed as $3.3 \delta/S$ and $10 \delta/S$ for LOD and LOQ, respectively.

The accuracy of the analytical method was investigated by spiking unloaded microparticles (M1FA0 and M2FA0) with known concentrations of the stock solution to achieve final theoretical drug concentrations of 15, 45 and 65 $\mu\text{g/mL}$. The accuracy value was determined by calculating the percent recovery of FA for these three concentration levels and then determining the relative standard deviation (RSD).

The precision was assessed at two levels: repeatability (intraday precision) and intermediate precision (inter-day precision) using M1FA10. The repeatability was

investigated by testing three different sample solutions at 15, 40 and 65 $\mu\text{g/mL}$ on the same day. Three samples solutions at 40 $\mu\text{g/mL}$ were also evaluated in other two different days in order to determine intermediate precision. Results were reported in terms of RSD.

In order to determine the robustness, experimental conditions were purposely changed to check the reproducibility of the method. Robustness was evaluated by analyzing drug content of the microparticles (M1FA10) with variations in the temperature of analytical column (30 and 40°C), flow rate (0.9 and 1.1 mL/min) and pH of mobile phase (4.0 and 6.0). Samples were evaluated in triplicate for each variation of the method conditions. Chromatograms were recorded and compared with the previously reported chromatographic conditions.

2.9 Forced degradation study

Forced degradation studies were also carried out in order to provide some information about drug stability and specificity of the proposed method. The standard solution of FA was subject to accelerated degradation by acid, basic and photolytic conditions.

To investigate the acid degradation, 6.25 mL of the stock standard solution (1.0 mg/mL) was diluted into a 25 mL volumetric flask with 0.1 M HCl. This solution was maintained at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and protected from light for 1 h. After the reaction time, the solution was neutralized using 0.1 M NaOH. The solution was diluted with methanol to achieve a final concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ before injection into the HPLC system. The same procedure was used for the alkaline degradation, except by the fact that 0.1 M HCl was replaced by 0.1 M NaOH in sample preparation.

For photodegradation, 3 mL of FA methanol solution (1 mg/mL) was placed in a quartz cuvette and subsequently exposed to UV radiation (Phillips TUV lamp–254 nm, 30 W) for 6 h in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm) at a fixed distance. At predetermined times (0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h) of exposure to light, 400 μL of the samples were withdrawn and diluted with methanol (final concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ of FA) in order to quantify the remaining FA according to the method previously described. In order to refute the hypothesis of thermal degradation, a cuvette containing FA methanol solution (final concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ of FA) was covered by aluminum paper and was evaluated as the same way. The degradation rate

kinetics of FA was determined and the best fit was used for indicating the reaction order. The kinetic models used were: zero order ($C = C_0 - kt$), first order ($\ln C = \ln C_0 - kt$) and second order equation ($1/C = 1/C_0 + kt$).

2.10 Evaluation of encapsulation efficiency

In order to demonstrate the applicability of the validated method, the encapsulation efficiency (EE) of FA into PHBV/PCL microparticles was calculated using Equation 1 from the HPLC results provided by sample solutions.

$$EE(\%) = \frac{\text{total drug content} - \text{free drug content}}{\text{total drug content}} \times 100 \quad (1)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Method Development and Optimization

Previous tests were carried out in order to provide a quick and effective method for analyzing FA using HPLC. The investigated chromatographic conditions were mainly related to the mobile phase composition. Initial runs were performed using a mobile phase mixture of acetonitrile:water (16:84 v/v) containing 1% glacial acetic acid based on a previously reported method for FA quantification in plasma [19]. However irregular peaks were observed, showing low chromatographic resolution probably due to instrumental and column differences.

In order to improve the quality of chromatographic method, various ratios in isocratic mode were tested using different mixtures of acetonitrile:methanol:water adjusted to pH 3.0 with acetic acid. These assays demonstrated that the proportion of acetonitrile:methanol:water adjusted to pH 3.0 with acetic acid (24:24:52 v/v) was more appropriate for the method optimization. In spite of the symmetry of FA peak, no repeatability and accuracy were observed using this mobile phase.

Therefore additional experiments were carried out removing acetonitrile and using acetic acid and ortho-phosphoric acid as acidifying agents at different pH values. The mobile phase composed by methanol:water adjusted to pH 3.0 using ortho-phosphoric acid (48:52 v/v) provided a lower tailing and a more symmetric peak for FA with a lower retention time (theoretical plates = 1253, $k' = 3.77$ and tail factor =

1.3). The peak was detected at 4.86 min (Figure 2) which is very suitable for routine analyses.

In summary, methanol:water adjusted to pH 3.0 using ortho-phosphoric acid (48:52 v/v), column temperature at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sample injection volume of 10 μL , isocratic flow rate of 1.0 mL/min, detector set at 320 nm, and run time of 8 minutes were chosen as suitable chromatographic conditions for further procedures including the method validation.

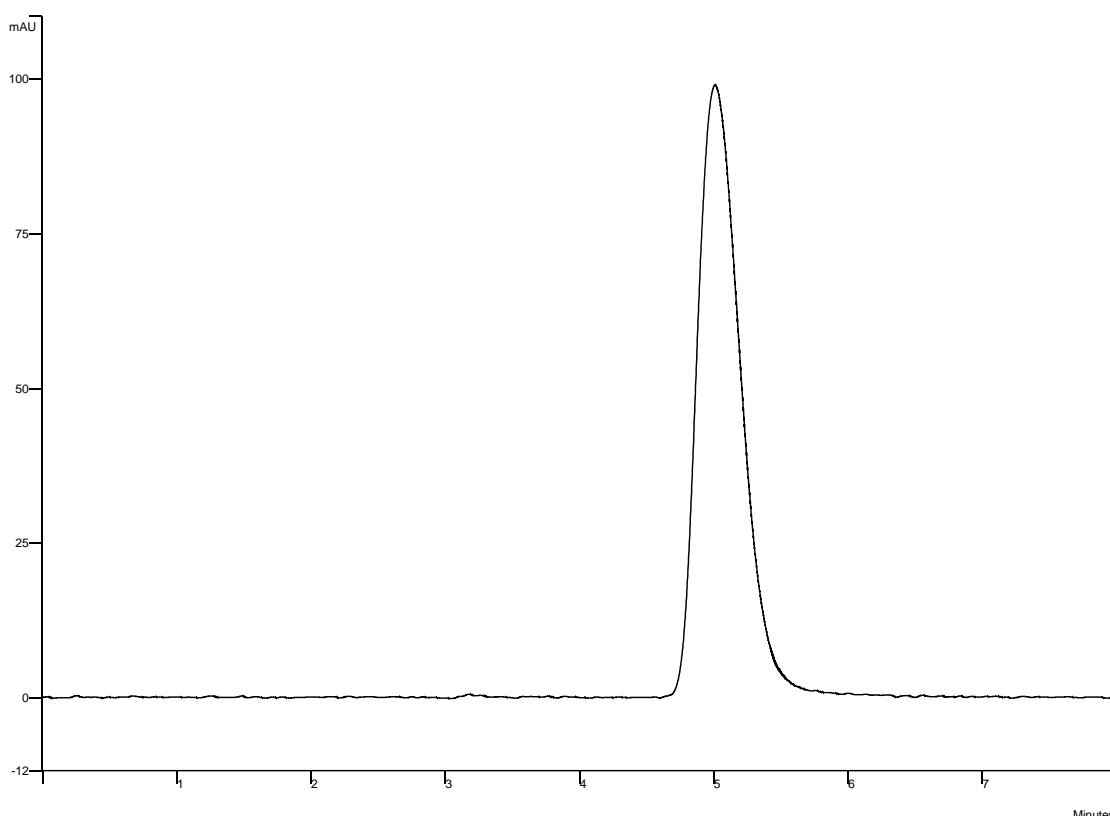


FIGURE 2: Representative HPLC chromatogram of ferulic acid standard (40 $\mu\text{g/mL}$) in methanol:water adjusted to pH 3.0. Mobile phase: methanol:water adjusted to pH 3.0 using *ortho*-phosphoric acid (48:52 v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 320 nm; column temperature: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and injection volume: 10 μL .

3.3. Method Validation

The proposed method was validated by determining its performance characteristics regarding specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision and robustness [29].

3.3.1. Specificity

Specificity was demonstrated by comparing the chromatograms of unloaded and FA-loaded microparticles prepared as per test method. The results showed that there was no interference at the retention time of FA from the other formulation components. In that sense, it is possible to confirm the specificity of the purposed method (Figure 3). Moreover, the photodiode array detector indicated that FA peak was free from interference (purity index > 0.9999).

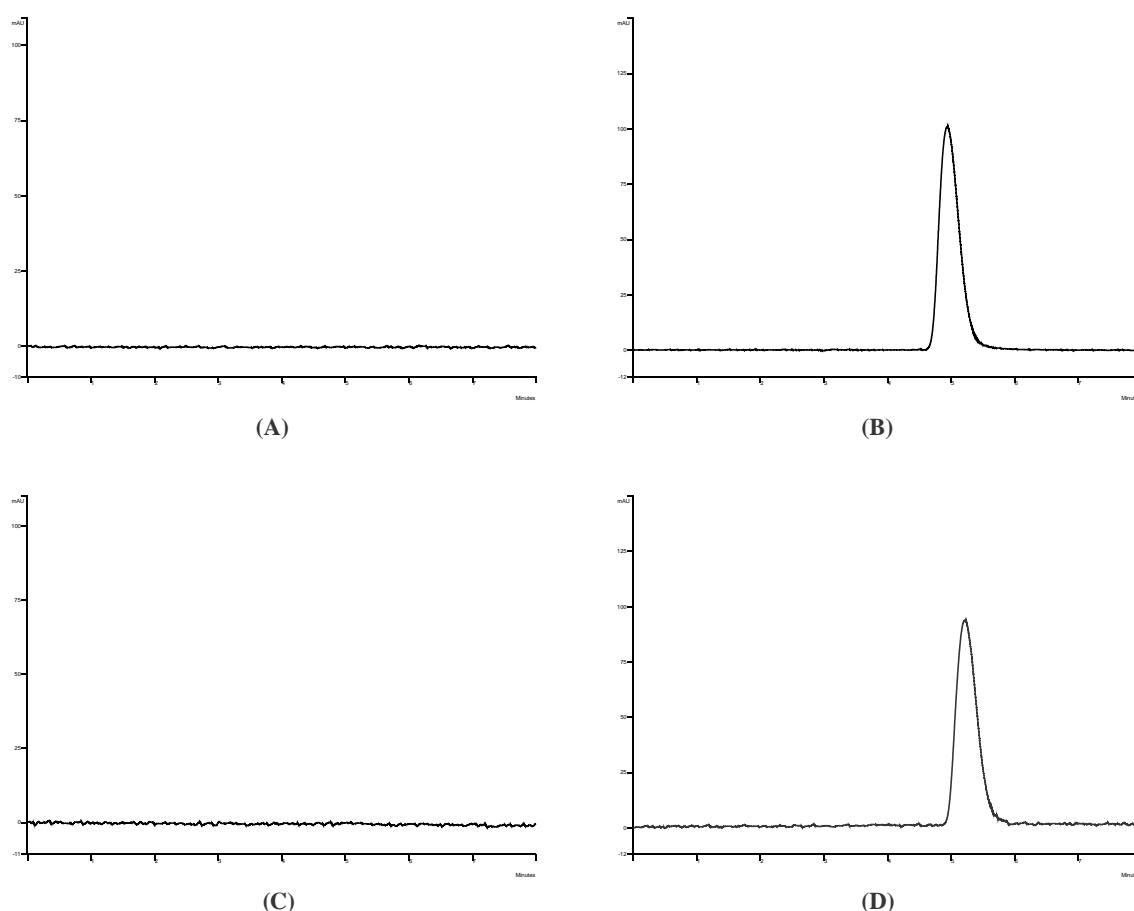


FIGURE 3: HPLC chromatograms ($\lambda = 320$ nm) obtained from unloaded and FA-loaded microparticles: M1FA0 (A), M1FA10 (B), M2FA0 (C) and M2FA10 (D).

3.3.2. Linearity

A linear relationship between peak area and concentration of FA at the concentration range of 10.0 to 70.0 $\mu\text{g/mL}$ was observed (Figure 4). The linear equation obtained by the least-square method was $y = 51.1011x + 26.2381$, where y is the peak area and x is the standard solution concentration in $\mu\text{g/mL}$. A suitable

correlation coefficient ($r = 0.9998$) was recorded which demonstrates that the method is remarkable linear with an r value of nearly 1 at the purposed range.

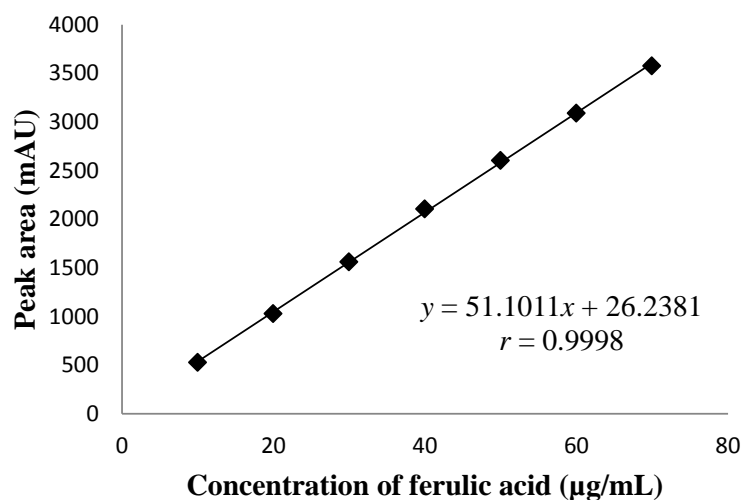


FIGURE 4: Mean calibration curve obtained for FA using working standard solutions at the concentration range of 10,0 to 70,0 µg/mL ($n = 3$).

3.3.3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The lowest concentration where FA can be detected (LOD) and quantified (LOQ) with acceptable precision and accuracy was 0.334 and 1.012 µg/mL, respectively. These results represent that the chromatographic method is suitable enough to detect and quantify FA at the concentration range of 10.0 to 70.0 µg/mL.

3.3.4. Accuracy

The accuracy was evaluated using a recovery study and showed mean recoveries for the three levels of concentration ranging between 99 and 101% (Table 3). These recovery values indicate that the developed method was accurate for the determination of FA in polymeric microparticles.

Table 3: Accuracy assays for ferulic acid analysis*

Level of concentration	Theoretical concentration ($\mu\text{g/ mL}$)	Experimental concentration ($\mu\text{g/ mL}$)	Recovery (%)	RSD** (%)
Low	15	15.11 \pm 0.25	100.73	1.65
Medium	45	44.91 \pm 0.44	99.80	0.98
High	65	64.36 \pm 0.55	99.02	0.85

* $n = 3$, **RSD = relative standard deviation

3.3.5. Precision

Precision was verified by repeatability and intermediate precision as presented in Table 4. The relative standard deviation (RSD) values were less than 1.43% and 1.93% for intra- and inter-day precision, respectively. These results confirm the good precision of the chromatographic method.

Table 4: Repeatability and intermediate precision data for ferulic acid analysis

Sample solution ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration \pm SD* ($\mu\text{g/mL}$)	RSD** (%)
Repeatability ($n=9$)		
15	16.82 \pm 0.24	1.43
40	40.21 \pm 0.31	0.77
65	64.67 \pm 0.30	0.46
Intermediate precision ($n=3$)		
Day 2		
40	39.44 \pm 0.05	0.13
Day 3		
40	40.32 \pm 0.78	1.93

*SD = standard deviation; **RSD = relative standard deviation

3.3.6. Robustness

The evaluation of robustness was based on RSD values obtained by changing analytical parameters such as temperature of analytical column (30 and 40°C), isocratic flow rate (0.9 and 1.1 mL/min) and pH of mobile phase (4.0 and 6.0). Concerning these parameters, the method was considered robust due to RSD for the drug content analyses values were lower than 2.24% as summarized in Table 5. Therefore changes in these chromatographic parameters did not affect the analysis of FA into polymeric microparticles. As expected, some variation in the retention time was observed without compromising the determination of drug content.

Table 5: Robustness data for ferulic acid analysis ($n=3$)

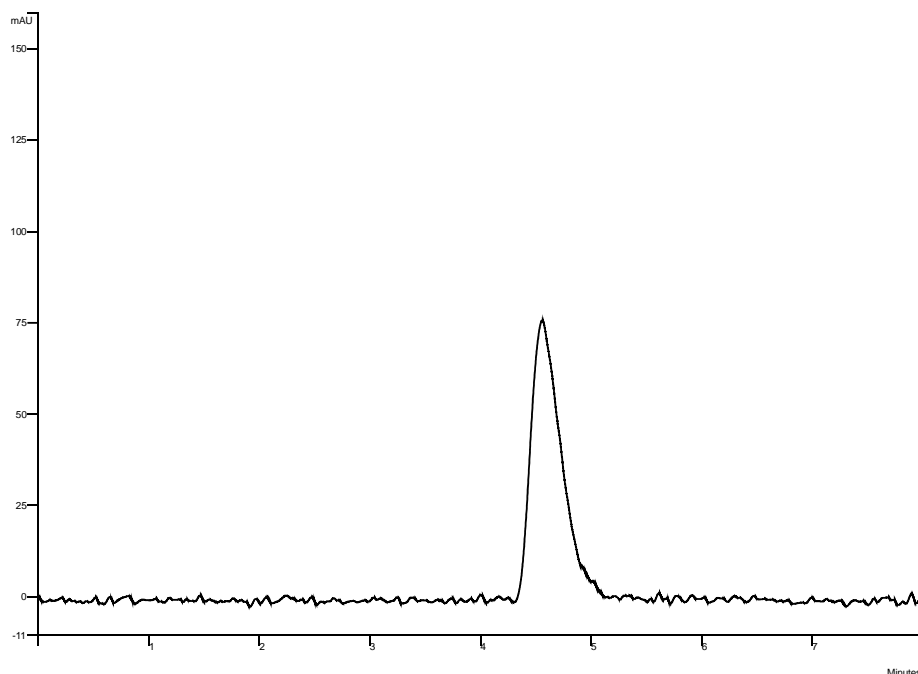
Parameter		Drug content (%) \pm SD*	RSD**	Retention time (min)
Flow rate (mL/min)	0.9	102.71 \pm 1.93	1.88	5.39
	1.0	100.12 \pm 0.60	0.60	4.86
	1.1	99.78 \pm 0.57	0.57	4.49
	3.0	100.12 \pm 0.60	0.60	4.86
pH of mobile phase	4.0	97.56 \pm 0.98	1.00	4.80
	6.0	98.03 \pm 0.37	0.38	4.52
Temperature (°C)	ambient	100.12 \pm 0.60	0.60	4.86
	30	100.09 \pm 1.09	1.09	4.71
	40	99.14 \pm 2.22	2.24	4.44

*SD = standard deviation; **RSD = relative standard deviation

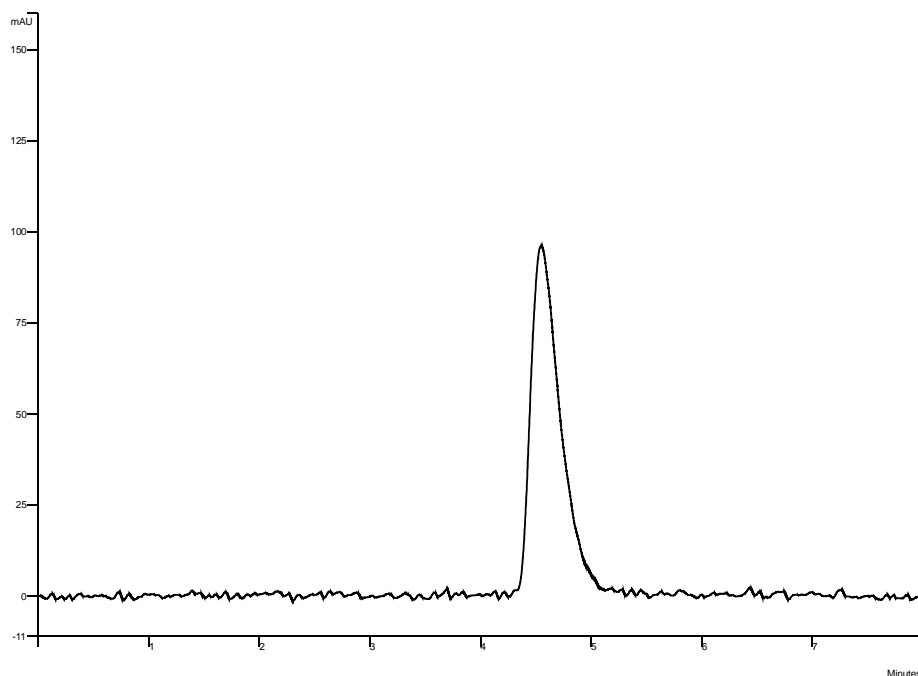
3.4 Forced degradation study

Regarding the presence of degradation products, forced degradation study showed different results depending on the stress condition used. After exposure to acid medium, approximately 29.37% of FA was degraded (Figure 5A) and the drug peak was recorded at 4.56 min. In alkaline condition, a FA degradation of 16.33% was observed and the drug peak was detected at 4.55 min (Figure 5B). No previous report was devoted to investigate the drug degradation using 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH. Under photolytic conditions, decreases in FA concentration from methanol solution were observed (Figure 6). On the other side, the cuvette covered by aluminum paper showed no degradation after 6 h which indicates that no thermal

degradation was involved in the photodegradation process. Moreover, no additional peak was verified in the chromatograms of the forced degradation study demonstrating that the degradation products were not detected using the optimized chromatographic conditions.



(A)



(B)

FIGURE 5: Chromatograms obtained after one hour of FA exposure under acid (A) and alkaline (B) conditions.

Aiming at elucidating the kinetics of FA photodegradation from methanol solution, the experimental data were fitted to zero, first and second order equations. These plots (Figure 6) indicated that FA photodegradation process in methanol solution followed a second order kinetic with a rate constant of $6.27 \times 10^4 \text{ L/mol} \times \text{h}$. In this case, the degradation of FA is dependent on the drug concentration.

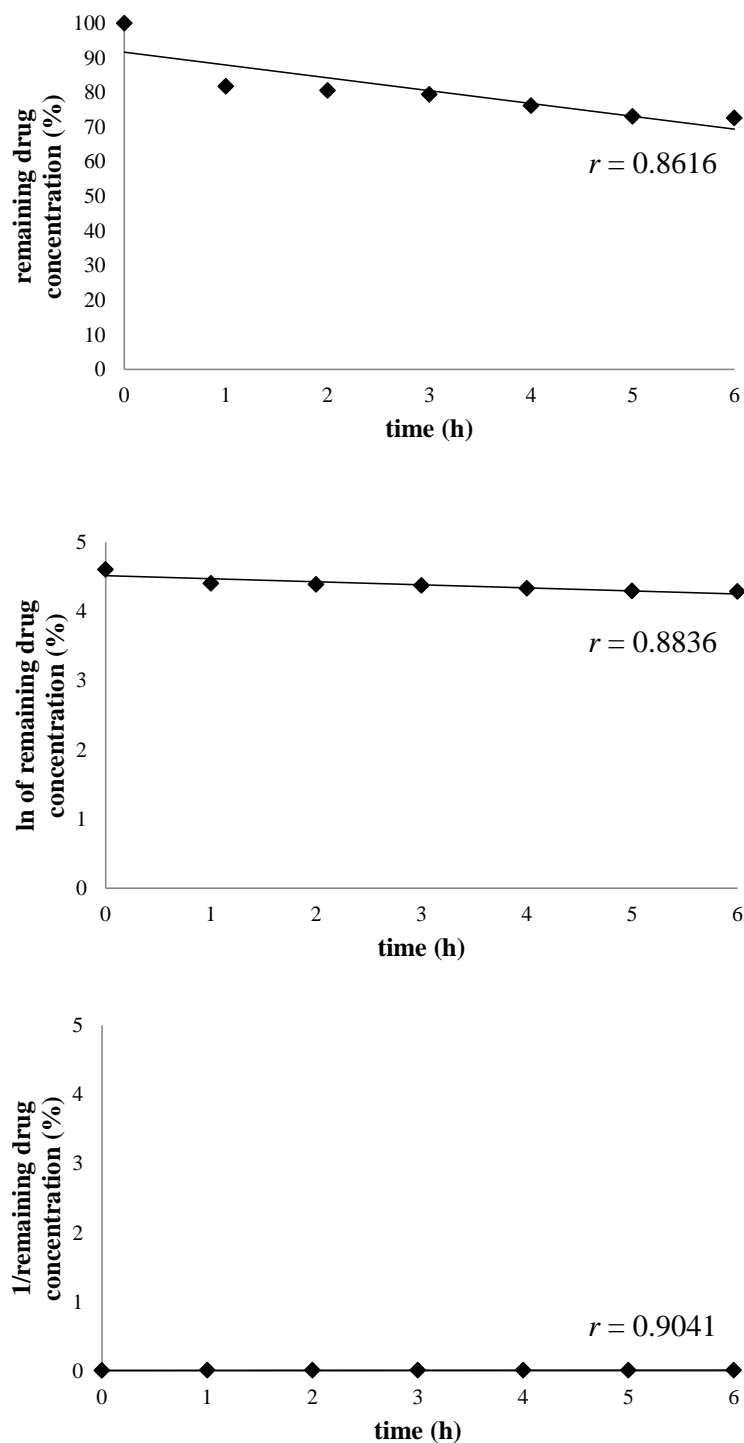


FIGURE 6: Plots of remaining FA concentration *versus* time for zero order (A), first order (B), and second order (C) equations.

3.5 Evaluation of encapsulation efficiency

The drug content and encapsulation efficiency (EE) of FA into PHBV/PCL microparticles was carried out by the previously validated HPLC-DAD method and the obtained results are represented in Table 6. High percentages of drug entrapment were obtained for PHBV/PCL microparticles by simple emulsion/solvent evaporation. All formulations showed suitable EE values higher than 98%.

These values are mainly based on the poor aqueous solubility (6.63 mg/dL at pH = 7.2) of FA [4] which leads to increase the drug loaded into polymeric microparticles. The current results are similar or better than the previously reported. Stearic acid- and stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles containing *trans*-FA revealed a drug entrapment of 95.4 and 97.7%, respectively [12]. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing FA showed EE of about 76% [7]. A FA entrapment higher than 60% was achieved for inclusion complex of *trans*-FA and hydroxypropyl- β -cyclodextrin that was prepared by the freeze-drying method [2].

Therefore, the validated method was successfully applied to the determination of FA into polymeric microparticles and can be considered an important tool for the quality control of these promising formulations.

Table 6: Ferulic acid-loaded* and encapsulation efficiency (EE) for PHBV/PCL microparticles

Microparticles	Ferulic acid-loaded (mg,g ⁻¹)	EE (%)
M1FA5	49.51 \pm 0.21	99.02
M1FA10	100.12 \pm 0.60	100.12
M1FA20	198.65 \pm 0.97	99.32
M2FA5	49.35 \pm 1.76	98.70
M2FA10	98.70 \pm 2.06	98.70
M2FA20	198.20 \pm 2.45	99.10

*mean ($n = 3$) \pm standard deviation

CONCLUSION

A simple and efficient reverse-phase HPLC-DAD method was developed and validated for quantitative determination of FA into polymeric microparticles. In summary, the method found to be specific, linear, accurate, precise, and robust for a rapid determination of this drug and can be used for studying the stability and degradation kinetics of FA.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to CAPES/Brazil for financial support.

REFERENCES

- [1] Mancuso, C.; Santangelo, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol.*, **2014**, 65, 185–195.
- [2] Wang, J.; Cao, Y.; Sun, B.; Wang, C. Characterization of inclusion complex of *trans*-ferulic and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Food Chem.*, **2011**, 124, 1069-1075.
- [3] Itagaki, S.; Kurokawa, T.; Nakata, C.; Saito, Y.; Oikawa, S.; Kobayashi, M.; Hirano, T.; Iseki, K. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.*, **2009**, 114, 466-471.
- [4] Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Pasquale, A.; Uccella, N.; Barbuzzi, T.; Paolino, D.; Bonina, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm.*, **2000**, 199, 39–47.
- [5] Zhao, Z.; Moghadasian, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.*, **2008**, 109, 691–702.
- [6] Roleira, F. M.; Siquet, C.; Orrù, E; Garrido, M.; Garrido, J.; Milhazes, N.; Podda, G.; Paiva-Martins, F.; Reis, S.; Carvalho, R. A.; Silva, E. J. T.; Borges, F. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 5816–5825.
- [7] Merlin, J. P. J.; Prasad, N. R.; Shibli, S. M. A.; Sebeela, M. Ferulic acid loaded Poly-*D,L*-lactide-co-glycolide nanoparticles: Systematic study of particle size, drug

encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line *in vitro*. *Biomed Prev Nutr.*, **2012**, 2, 69-76.

[8] Staniforth, V.; Huang, W-C.; Aravindaran, K.; Yang, N-S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrixmetalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. *J Nutr Biochem.*, **2012**, 23, 443-451.

[9] Du, N.; Cao, S.; Yu, Y. Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 1697-1703.

[10] Yu, D-G.; Yang, J-M., Branford-White, C.; Lu, P.; Zhang, L.; Zhu, L-M. Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *Int. J. Pharm.*, **2010**, 400, 158-164.

[11] Scalia, S.; Mezzena, M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical – stability. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2009**, 49, 90-94.

[12] Trombino, S.; Cassano, R.; Ferrarelli, T.; Barone, E.; Picci, N.; Mancuso, C. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. *Colloids Surf., B.*, **2013**, 109, 273– 279.

[13] Birnbaum, D. T.; Brannon-Peppas, L. Microparticle drug delivery systems. In: *Drug delivery systems in cancer therapy*, 1nd ed.; Brown, D.M.; Totowa: Humana Press, **2003**, pp. 117-135.

[14] Reinke, S. M. G.; Rastelli, M. C. S.; Garcia, R.; Esmerino, L. A.; De Paula, J. P.; Dos Santos, F. A.; Farago, P. V. Chlorhexidine Digluconate-Loaded (Meth)Acrylic Microparticles: High Encapsulation Efficiency and Prolonged Release. *Lat. Am. J. Pharm.* **2014**, 33 (1), 47-55.

[15] Tran, V-T.; Benoit, J-P.; Venier-Julienne, M-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy?. *Int. J. Pharm.*, **2011**, 407, 1–11.

[16] Ng, S-M.; Choi, J-Y.; Han, H-S.; Huh, J-S.; Lim, J. O. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound. *Int. J. Pharm.*, **2010**, 384, 120–127.

[17] Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.*, 2008, 363, 26-39.

[18] Anselmi, C.; Centini, M.; Ricci, M.; Buonocore, A.; Granata, P.; Tsuno, T.; Facino, R.M. Analytical characterization of a ferulic acid/gama-cyclodextrin inclusion complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 40, 875-881.

- [19] Li, Y.; Bi, K. HPLC determination of ferulic acid in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong and its compound preparation. *Biomed. Chromatogr.*, **2003**, 17, 543–546.
- [20] Li, X.; Li, X.; Wang, L.; Li, Y.; Xu, Y.; Xue, M. Simultaneous determination of danshensu, ferulic acid, cryptotanshinone and tanshinone IIA in rabbit plasma by HPLC and their pharmacokinetic application in danxiongfang. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 44, 1106–1112.
- [21] Lin, I-J.; Cham, T-M.; Wu, S-M. Simultaneous Determination of Hesperidin, Ferulic Acid, Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde in Chinese Tonic Wine by High Performance Liquid Chromatography. *J. Chin. Chem. Soc.*, **2010**, 57, 429-435.
- [22] Chen Y.; Li, Y.; Chen, X.; Wang, L.; Sun, C.; Yan, W.; Liu, X. Development and Validation of a HPLC Method for the Determination of Five Bioactive Compounds in the “Xuebijing” Injection. *Anal. Lett.*, **2010**, 43 (15), 2456-2464.
- [23] Vichapong, J.; Sookserm, M.; Srijesdaruk, V.; Swatsitang, P.; Srijaranai, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *Food Sci Technol Int.*, **2010**, 43, 1325–1330.
- [24] Weon, J. B.; Ma, J. Y.; Yang, H. J.; Ma, C. J. Simultaneous Determination of Ferulic Acid, Hesperidin, 6-Gingerol and Glycyrrhizin in Insampaedok-san by HPLC Coupled with Diode Array Detection. *J. Anal. Chem.*, **2012**, 67 (12), 955–959.
- [25] Ouyang, Z.; Zhao, M.; Tang, J.; Pan, L. *In vivo* pharmacokinetic comparisons of ferulic acid and puerarin after oral administration of monomer, medicinal substance aqueous extract and Nao-De-Sheng to rats. *Phcog Mag.*, **2012**, 8 (32), 256-262.
- [26] Kareparamban, J. A.; Nikam, P. H.; Jadhav, A. P.; Kadam, V. J. A Validated High-performance Liquid Chromatography Method for Estimation of Ferulic Acid in Asafoetida and Polyherbal Preparation. *Indian J Pharm Sci.*, **2013**, 75(4), 493-5.
- [27] ICH Q1A (R2), Stability Testing of new Drug Substances and Products, **2003**.
- [28] ICH Q1B, Photostability testing on new drug substances and products, **1996**.
- [29] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, **2005**.
- [30] Riekes, M. K.; Barboza, F. M.; Vecchia, D. D.; Bohatch Jr., M.; Farago, P. V.; Fernandes, D.; Silva, M. A. S.; Stulzer, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. *Mat Sci Eng C.*, **2011**, 31, 962–968.

APÊNDICE 2 - MANUSCRITO 2**SPRAY-DRIED EUDRAGIT[®] L100 MICROPARTICLES CONTAINING FERULIC ACID: FORMULATION, *IN VITRO* CYTOPROTECTION AND *IN VIVO* ANTI-PLATELET EFFECT**

Artigo publicado no periódico ***Materials Science and Engineering: C***

v. 64 (2016) p. 318–328

<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.086>

Spray-dried Eudragit[®] L100 Microparticles Containing Ferulic Acid: Formulation, *In Vitro* Cytoprotection and *In Vivo* Anti-platelet Effect

Jessica Mendes Nadal^a, Mona Lisa Simionatto Gomes^a, Débora Maria Borsato^b,
Martinha Antunes Almeida^c, Fernanda Malaquias Barboza^b, Sônia Faria Zawadzki^c,
Carla Cristine Kanunfre^d, Paulo Vitor Farago^{*b} and Sandra Maria Warumby Zanin^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Brazil

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Brazil

^c Postgraduate Program in Chemistry, Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Brazil

^d Postgraduate Program in Biomedical Science, Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, Brazil

*Address correspondence to this author at the State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Av., 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil;

Tel: +55 42 32203115; Fax: +55 42 32203102;

E-mail: pvfarago@gmail.com

ABSTRACT

This paper aimed to obtain new spray-dried microparticles containing ferulic acid (FA) prepared by using a methacrylic polymer (Eudragit® L100). Microparticles were intended for oral use in order to provide a controlled release, and improved *in vitro* and *in vivo* biological effects. FA-loaded Eudragit® L100 microparticles were obtained by spray-drying. Physicochemical properties, *in vitro* cell-based effects, and *in vivo* platelet aggregation were investigated. FA-loaded Eudragit® L100 microparticles were successfully prepared by spray-drying. Formulations showed suitable encapsulation efficiency, i.e. close to 100%. Microparticles were of spherical and almost-spherical shape with a smooth surface and a mean diameter between 2 and 3 μm . Fourier-transformed infrared spectra demonstrated no chemical bond between FA and polymer. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry analyses indicated that microencapsulation led to drug amorphization. FA-loaded microparticles showed a slower dissolution rate than pure drug. The chosen formulation demonstrated higher *in vitro* cytoprotection, anti-inflammatory and immunomodulatory potential and also improved *in vivo* anti-platelet effect. These results support an experimental basis for the use of FA spray-dried microparticles as a feasible oral drug delivery carrier for the controlled release of FA and improved cytoprotective and anti-platelet effects.

KEYWORDS: anti-inflammatory, antioxidant, methacrylic polymer, phytoalexin, platelet aggregation.

1. INTRODUCTION

Ferulic acid (FA; $C_{10}H_{10}O_4$; M_W : 194.18 Da) or (*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (Figure 1) is a chemical compound that is extremely abundant in plants. It has low toxicity and is synthesized from shikimate pathway via phenylalanine or L-tyrosine. In nature, it occurs mainly as a *trans* isomer [1,2]. In relation to its physicochemical and biological properties, FA has an aqueous solubility of 6.63 mg.dL⁻¹ at pH 7.2 [3], a half-life of 42 min [4] and a log P of 1.67 [5].

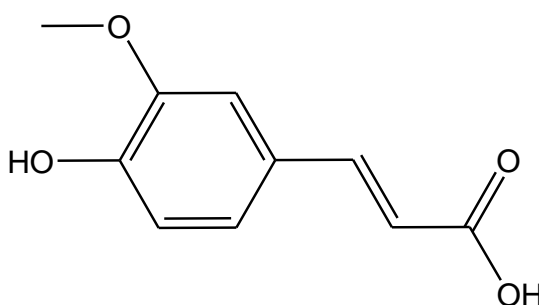


Fig. 1 Chemical structure of ferulic acid

Previous studies have demonstrated that FA has various therapeutic uses, including anti-inflammatory, antioxidant, antithrombotic, anticancer, neuroprotective and cardioprotective effects. When applied to the skin, FA has a photo-protective activity [6–10, 1]. In spite of these biological potential, its medical use is restricted due to some physicochemical properties such as low aqueous solubility [3]. FA has a hydrophobic nature, it can oxidize, and it is a photosensitive compound which results in partial conversion of *E* to *Z* isomer [11]. In that sense, its bioavailability is usually decreased, leading to a minimal *in vivo* effect by oral administration [1].

Because of these unsuitable physicochemical properties, polymeric drug delivery systems have been developed in order to improve stability, increase bioavailability and/or enhance biological effect of FA. Chitosan was successfully grafted to FA by a carbodiimide-mediated coupling reaction to improve its antioxidant activity and water solubility [12]. Inclusion complexes between *E*-FA and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) were prepared by a freeze-drying method and they provided increased solubility and higher stability for FA [1]. Stearic acid- and stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles containing *E*-FA facilitated FA uptake by cells because of their lipophilic structure, which improved FA bioavailability [13]. FA-loaded nanoparticles prepared by a double emulsion method increased *in vitro*

anticancer properties in relation to NCI-H460 cancer cells in comparison with free FA [6]. Despite the aforementioned studies, the literature does not report studies involving FA-loaded methacrylic microparticles prepared by spray-drying which are particularly developed for enhancing its cytoprotective and antioxidant effects. In addition, to the best of our knowledge, no previous paper has investigated the effect of microencapsulation on the anti-platelet activity of FA. Therefore, this new pharmaceutical dosage form, which was obtained by spray-drying, may provide improved biological effects for FA and may support its use as an alternative drug for treating cancer and thrombotic events.

In brief, spray-drying can transform a feed solution, suspension or emulsion from fluid state to dried particulate form by spraying into a hot drying medium [14]. This technique has been widely applied in the food, pharmaceutical and chemical industries. In pharmaceutical industry, spray-drying is an attractive microencapsulation method for oral, pulmonary and topical drug delivery. Unlike solvent-based microencapsulation methods, such as oil in water and oil in oil emulsification processes, spray-drying offers a number of advantages. It is a single-step, continuous process that does not involve secondary drying of particles that are produced. The procedure is highly reproducible, low-cost, easy to scale up and offers a narrow particle size distribution [14].

Taking all the above into account, this paper aimed to obtain new spray-dried microparticles, which were prepared using a widely used methacrylic polymer (Eudragit® L100) and which were intended for oral use to provide a controlled release of FA in order to improve its biological properties as a cytoprotective and anti-platelet agent.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Ferulic acid (99.80% pure FA, Suzhou Leader Chemical, Suzhou, China) and poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) (Eudragit® L100, Mw = 125.000 g.mol⁻¹, Röhm Pharma Polymers, Darmstadt, Germany) were used as received. As an internal standard, *E*-ferulic acid, matrix substance ≥ 99.0% (HPLC) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade methanol was

also provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). For microencapsulation, ultrapure water obtained by a Milli-Q[®] ultrapure water purification system (Millipore, Bedford, USA) was used. J774A.1 cells, which is a murine macrophage cell line, were kindly provided by Dr. Rui Curi of University of São Paulo, Brazil. RPMI 1640 medium, fetal bovine serum, penicillin and streptomycin were purchased from Vitrocell (Campinas, Brazil). Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5 (LPS), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate were all purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). All the other reagents and solvents were of analytical grade.

2.2 Preparation of ferulic acid-loaded Eudragit[®] L100 microparticles

The preparation of microparticles was carried out by spray-drying method. Three different formulations (Table 1) were obtained, depending on the amount of FA in their composition (5, 10 and 20%) and they were designated as MFA5, MFA10, and MFA20. Briefly, FA and Eudragit[®] L100 were dispersed in ethanol under magnetic stirring and purified water was added. This liquid formulation was dried using a Labmaq model MSD 1.0 spray dryer (Ribeirão Preto, Brazil). The following operational parameters were used: diameter nozzle of 0.82 mm, atomizing air pressure of 3 kgf.cm⁻², air flow rate of 50 L.min⁻¹, feed flow rate of 0.20 L.h⁻¹, inlet air temperature of 150 ± 5 °C and outlet air temperature of 60 ± 5 °C. The dried powders were carefully recovered, weighed and stored in a well-closed glass vessel at room temperature in dark conditions. All formulations were obtained in triplicate from independent batches. Unloaded-microparticles (MFA0) were also prepared as negative control. In order to provide a comparative analysis, a physical mixture of FA and Eudragit[®] L100 was obtained in a 1:1 weight proportion.

Table 1 Composition of ferulic acid-loaded Eudragit[®] L100 microparticles

Composition	Formulation			
	MFA0	MFA5	MFA10	MFA20
Ferulic acid (g)	—	0.2	0.4	0.8
Poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) (Eudragit [®] L100) (g)	4.0	3.8	3.6	3.2
Ethanol (mL)	200.0	200.0	200.0	200.0
Purified water (mL)	200.0	200.0	200.0	200.0

2.3 Residual moisture

The water content of FA, Eudragit[®] L100 and microparticles (MFA0, MFA5, MFA10, and MFA20) was investigated using an infrared moisture analyzer (Shimadzu, model MOC63u, Kyoto, Japan). For each sample, an amount of 1.000 g was placed on an aluminum plate and dried at 105 °C until constant weight. The percentage corresponding to the mass loss was obtained as moisture content. This analysis was carried out in triplicate.

2.4 Characterization

2.4.1 Drug loading and encapsulation efficiency

The amount of FA in microparticles (mg.g^{-1}) and encapsulation efficiency (%) were assessed using an HPLC system (Varian Pro-star SYS-LC-240-E HPLC System, Walnut Creek, CA, USA). In brief, an exact mass of microparticles was weighed, which was equivalent to 20 mg of FA. This material was dispersed in 7 mL of methanol and kept for 12 h under magnetic stirring at $1000 \text{ rev.min}^{-1}$. The volume was then completed to 10 mL in a volumetric flask and filtered through a membrane filter of polyvinylidene fluoride (Durapore[®] membrane, 0.22 μm pore size, Millipore, Bedford, MA, USA). After suitable dilution in methanol, the concentration of FA was determined through HPLC using a Varian C₁₈ analytical column (Walnut Creek, CA, USA) (250 x 4.6 mm, 5 μm) using UV detection at 320 nm, in triplicate. The mobile phase consisted of methanol and water adjusted to pH 3.0 with 0.1 N

orthophosphoric acid (48:52 v/v) at an isocratic flow rate of 1.0 mL.mL⁻¹. The validation of this HPLC method was previously performed through the following parameters: linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, robustness, precision and specificity [15]. The concentration range varied from 10.0 to 70.0 µg.mL⁻¹. The linearity was 0.9998 and the detection limit was 0.334 µg.mL⁻¹ [16]. The encapsulation efficiency (EE) was obtained using Equation 1.

$$EE = \frac{\text{mass of FA in microparticles}}{\text{theoretical mass of FA}} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

2.4.2 Scanning electron microscopy (SEM)

The samples were mounted on aluminum stubs, sputtered with gold (IC-50 Ion Coater, Shimadzu, Kyoto, Japan), and analyzed using a scanning electron microscope (SSX-550 Superscan, Shimadzu, Kyoto, Japan) at an accelerating voltage of 10 or 15 kV with different magnifications.

2.4.3 Particle size and granulometric distribution

The particle size distribution was estimated by measuring about 200 particles with an assumed spherical shape in the arbitrary areas of the enlarged micrographs, which were produced by using Image Tool Software (3.0 version, San Antonio, TX, USA). The span, a mathematical value related to granulometric dispersion, was calculated using Equation 2.

$$\text{span} = \frac{d_{(v,90)} - d_{(v,10)}}{d_{(v,50)}} \quad (\text{Equation 2})$$

Where $d_{(v,10)}$, $d_{(v,50)}$, and $d_{(v,90)}$ are the particle diameters determined at the 10th, 50th, and 90th percentile of the undersized particle distribution curve, respectively.

2.4.4 Fourier-transformed infrared spectroscopy

The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra of raw materials, microparticles and physical mixture were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} using a Shimadzu IR Prestige-21 spectrophotometer (Kyoto, Japan) with KBr pellets with 32 scans and a resolution of 4 cm^{-1} .

2.4.5 X-ray powder diffraction

Wide-angle X-ray powder diffraction (XRPD) was performed using a Shimadzu X-ray diffractometer (Shimadzu XRD-6000, Kyoto, Japan). The 2θ value was increased from 5° to 80° at a scan rate of $2^\circ.\text{min}^{-1}$ using a $\text{Cu-K}\alpha$ source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA.

2.4.6 Thermal analyses

2.4.6.1 Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermogravimetric curves were obtained using a thermobalance (TGA-50, Shimadzu, Kyoto, Japan) at a temperature range of 25–900 $^\circ\text{C}$ using platinum crucibles with $5.0 \pm 0.1 \text{ mg}$ of sample under dynamic N_2 atmosphere (flow rate: 50 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$) and heat flow of 10 $^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$. The equipment was previously calibrated with copper sulphate pentahydrate.

2.4.6.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC curves of FA, Eudragit[®] L100, physical mixture and microparticles were obtained in a DSC-60 calorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan) using aluminum crucibles with $2.5 \pm 0.1 \text{ mg}$ of sample under dynamic N_2 atmosphere (flow rate: 50 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$). The temperature range was 25–220 $^\circ\text{C}$ with a heating rate of 10 $^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$. An empty aluminum pan was used as reference. The DSC cell was calibrated with indium (m.p. = 156.45 $^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusion}} = 28.54 \text{ J.g}^{-1}$) and zinc (m.p. = 419.45 $^\circ\text{C}$).

2.5 *In vitro* drug release

In vitro dissolution experiments were carried out for pure drug and FA-loaded microparticles. Dissolution assays were performed in a Nova Ética dissolution tester (299/6, Vargem Grande Paulista, Brazil) equipped with a basket (apparatus I) in 900 mL of degassed phosphate buffer solution pH = 7.0 (50 mM) [17,6] for 2 h in triplicate.

The system was kept at a thermostatically controlled temperature of 37 ± 0.5 °C and stirred at 50 rev.min⁻¹. All the experiments were performed under dark conditions. At predetermined time intervals, samples were collected (10 mL), filtered (0.45 µm pore size) and spectrophotometrically evaluated (Genesys 10S spectrophotometer, Thermo Scientific, Madison, WI, USA) at 320 nm according to a previously determined calibration curve (ranging from 2 to 12 µg.mL⁻¹, $y = 0.077x + 0.0027$, $r = 0.999$).

The dissolution values were obtained from the amount of drug that was released at each time interval. A correction factor was applied to the cumulative dilution caused by the replacement of the sample with an equal volume of fresh medium.

2.5.1 Analysis of release behavior

The dissolution profiles of pure FA and drug-loaded microparticles were compared by independent and dependent models, as summarized in Table 2. As model-independent analysis, the dissolution efficiency, which was the area under a dissolution curve between defined time points [18], was used. Profiles were also investigated by model-dependent methods using MicroMath Scientist™ 2.01 software (Salt Lake City, UT, USA). The data were tested to fit first-order, biexponential, zero-order and Weibull equations (Table 2) [19]. The selection of model-dependent method was based on the best correlation coefficient (r), the best model selection criteria (MSC), and the best graphic adjustment.

In order to have some insight into the drug release mechanism, a semi-empirical equation to describe drug release from polymeric systems, the power law (Korsmeyer-Peppas model) [20], was also applied (Equation 3).

$$ft = at^n \text{ (Equation 3)}$$

Where ft is the drug dissolved fraction at time t , n is the release exponent, which is indicative of drug release mechanism, and a is the constant, incorporating the structural and geometric characteristics of drug dosage form.

Table 2 Mathematical models related to dissolution experiments

Model	Equation
Dissolution efficiency	$DE = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\%$
First-order	$\%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponential	$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Zero-order	$\%D = kt$
Weibull	$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$

Legend: $\%D$ = dissolved percentage, b = shape parameter, TD = time interval necessary to release 63.2% of drug, k , α and β = kinetics constants, t = dissolution time, A and B = initial drug concentrations that contribute for the two dissolution stages

2.6 *In vitro* cell culture-based assays

2.6.1 Cell Culture

The J774A.1 cell line was incubated into plastic culture flasks containing RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 24 mM NaHCO₃, 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U.mL⁻¹) and streptomycin (100 µg.mL⁻¹) under 5% CO₂ at 37 °C. After 2-4 days, cells were scraped from each culture flask and centrifuged for 5 minutes at 125 x g. Cells were re-suspended in fresh medium and plated into appropriate multi-well plates (24 or 95 wells). The experiments were performed when cells reached about 70% confluence.

2.6.2 Cytotoxicity assay

Cell viability was determined via reduction of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to formazan [21]. The J774A.1 cells were seeded in 96-well plates. After overnight adhesion, cells were incubated for 48 h at 37 °C in culture medium containing free FA or MFA10 formulation at concentrations equivalent to 25, 50, 100 and 200 μM FA. FA was solubilized in culture medium containing 0.05% DMSO while spray-dried microparticles were dispersed only in supplemented RPMI 1640 medium. After incubation, supernatant cells were removed and MTT solution was added to cells at a final concentration of 0.5 mg.mL^{-1} for 30 min. Then, formazan was dissolved in DMSO and absorbance was spectrophotometrically measured at 546 nm using a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Non-treated cells in culture medium were used as control. J774A.1 cells in culture medium containing 0.05% DMSO were tested as vehicle. Cell viability was expressed in % related to the respective control.

2.6.3 Cytoprotection assay

Cells were seeded in 24-well plates. After overnight adhesion, cells were incubated in presence of free FA or MFA10 formulation at final concentrations equivalent to 50, 100 and 200 μM for 48 h. After incubation, supernatant cells were waived and cells were submitted to an acute exposure (1 h) of 600 μM H_2O_2 in PBS (the concentration of hydrogen peroxide that previously promoted a 50% reduction of cell viability). After this treatment PBS was removed and cells were incubated for 30 min in MTT solution (0.5 mg.mL^{-1}). Formazan was dissolved in DMSO and absorbance was measured using a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader (546 nm). Cell viability was expressed in % related to the control, which was not submitted to H_2O_2 exposure.

2.6.4 Assay for nitric oxide production

In order to determine nitric oxide (NO), nitrite production was measured in supernatants of cultured J774A.1 cells, based on Ding *et al.* 1988 [22]. Cells were

seeded in 24-well plates. After overnight adhesion, cells were incubated in the presence of free FA or MFA10 formulation at final concentrations equivalent to 50 and 100 μM . Cultures were kept at 37 °C under 5% CO_2 for 96 h. Cells were stimulated by 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS from *Escherichia coli* in the last 92 h. At the end of culture period, 100 μL of supernatant was removed and incubated with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4) at room temperature for 10 min. Absorbance was determined using a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader at 550 nm. An analytical curve for nitrite determination was previously obtained using sodium nitrite as standard. The control was not submitted to LPS.

2.6.5 Assay for intracellular reactive oxygen species generation

The generation of reactive oxygen species (ROS) was assessed using a ROS-sensitive fluorescence indicator, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). In order to determine the intracellular ROS generation, cells were seeded in black 96-well plates. After overnight adhesion, cells were incubated in the presence of free FA or MFA10 formulation at final concentrations equivalent to 50 and 100 μM . Cultures were kept at 37 °C under 5% CO_2 for 24 h. Cells were then incubated with DCFH-DA (25 μM) for 60 min in colorless (without phenol red) RPMI 1640 medium supplemented with 1% fetal bovine serum at 37 °C in the dark. Fluorescence intensity was measured every 10 min at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm using a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader.

2.7 In vivo platelet aggregation assay

2.7.1 Animals

Anti-platelet activity experiments were performed using male Wistar rats weighing about 200 g, which were obtained from the Central Animal Facility of State University of Ponta Grossa (Brazil). Animals were kept at 22 ± 2 °C with *ad libitum* access to food and water in controlled conditions of light (light-dark cycle of 12/12 h).

2.7.2 Experimental protocol

Thirty-two rats were randomly divided into four groups of eight animals. Group 1 received MFA0 unloaded microparticles (equivalent mass to group 3, orally), Group 2 received pure FA (30 mg.kg⁻¹, orally), Group 3 received FA-loaded Eudragit® L100 microparticles MFA10 (amount equivalent to 30 mg of FA.kg⁻¹, orally) and Group 4 received aspirin as standard anti-platelet agent (30 mg.kg⁻¹, orally). These treatments were carried out during 10 consecutive days by a gastric gavage once-a-day. Six hours after the last administered dose rats were anesthetized with ketamine and xylazine (55 and 8 mg.kg⁻¹, respectively) and their right carotid artery was cannulated for blood sampling. Finally, rats were slaughtered using an anesthetic overdose.

2.7.3 Preparation of platelet rich plasma (PRP) and platelet poor plasma (PPP)

Fresh blood (6 mL) was collected in tubes containing 4% trisodium citrate solution. Samples were centrifuged at room temperature for 15 min at 100 x g to obtain PRP. Plasma was carefully removed and centrifuged at 900 x g for 10 min to obtain a platelet pellet which was re-suspended in sufficient fresh autologous plasma. Supernatant from final centrifugation was the platelet poor plasma (PPP).

2.7.4 Platelet aggregation test

The platelet aggregation assay was performed in a 96-well plate and absorbance was obtained using a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader at 650 nm. An agonist (collagen type I, 4 µg.mL⁻¹) was added into each well. Then, plasma containing platelets at a concentration of 200 x 10⁶ platelets/well was added for a final volume of 150 µL. Readings were taken at time zero and after 15 min to induce platelet aggregation. Plate was shaken for 10 s before starting each test, with an amplitude of 2 mm (174 rpm) and 3 s before each reading and with an amplitude of 1 mm (114 rpm) at 37 °C.

2.7.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 5.00, San Diego, CA, USA). Results were expressed as mean \pm standard error of mean. Comparisons between groups were tested by one-way ANOVA. For *in vitro* cell culture-based assays, Tukey's *post hoc* test was performed. Bonferroni *post hoc* test was used for *in vivo* platelet aggregation assay. Critical significance level was set at $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

3. RESULTS

FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles were successfully obtained by the proposed spray-dried method. After drying, the materials showed a powdery aspect and a white color similar to pure Eudragit[®] L100. The yields were 65.4, 67.9 and 67.9%, respectively for MFA5, MFA10 and MFA20 microparticles.

Water contents of 1.47 ± 0.12 and $1.62 \pm 0.15\%$ were obtained for pure FA and Eudragit[®] L100, respectively. Microparticles showed only residual moisture values, as presented in Table 3.

Table 3 Water content¹, ferulic acid-loaded¹, encapsulation efficiency (EE)², particle size¹, and span for Eudragit[®] L100 microparticles

Material	Water content (%)	FA-loaded (mg,g ⁻¹)	EE (%)	Particle size (μm)	Span
MFA0	1.58 ± 0.12	—	—	2.46 ± 0.99	1.44
MFA5	1.40 ± 0.09	102.08 ± 1.78	102.08	2.48 ± 1.29	1.53
MFA10	1.43 ± 0.10	204.42 ± 2.45	102.21	2.61 ± 1.16	1.32
MFA20	1.52 ± 0.08	404.10 ± 2.32	100.82	2.54 ± 0.99	1.33

¹mean ($n = 3$) \pm standard deviation; ²mean ($n = 3$)

3.1 Drug loading and encapsulation efficiency

The drug content (mg.g^{-1}) and encapsulation efficiency (%) for microparticles are summarized in Table 3. A high percentage of drug entrapment was obtained for the Eudragit[®] L100 microparticles by spray drying. All formulations showed suitable EE values, which were close to 100%.

3.2 Scanning electron microscopy

The scanning electron micrographs of Eudragit[®] L100 microparticles are shown in Figure 2. Using SEM, Eudragit[®] L100 microparticles had spherical and almost-spherical shapes and a smooth surface (Figure 2, A–D). No pores were observed on the surface of all formulations. Moreover, MFA20 formulation showed residual FA on the surface of microparticles.

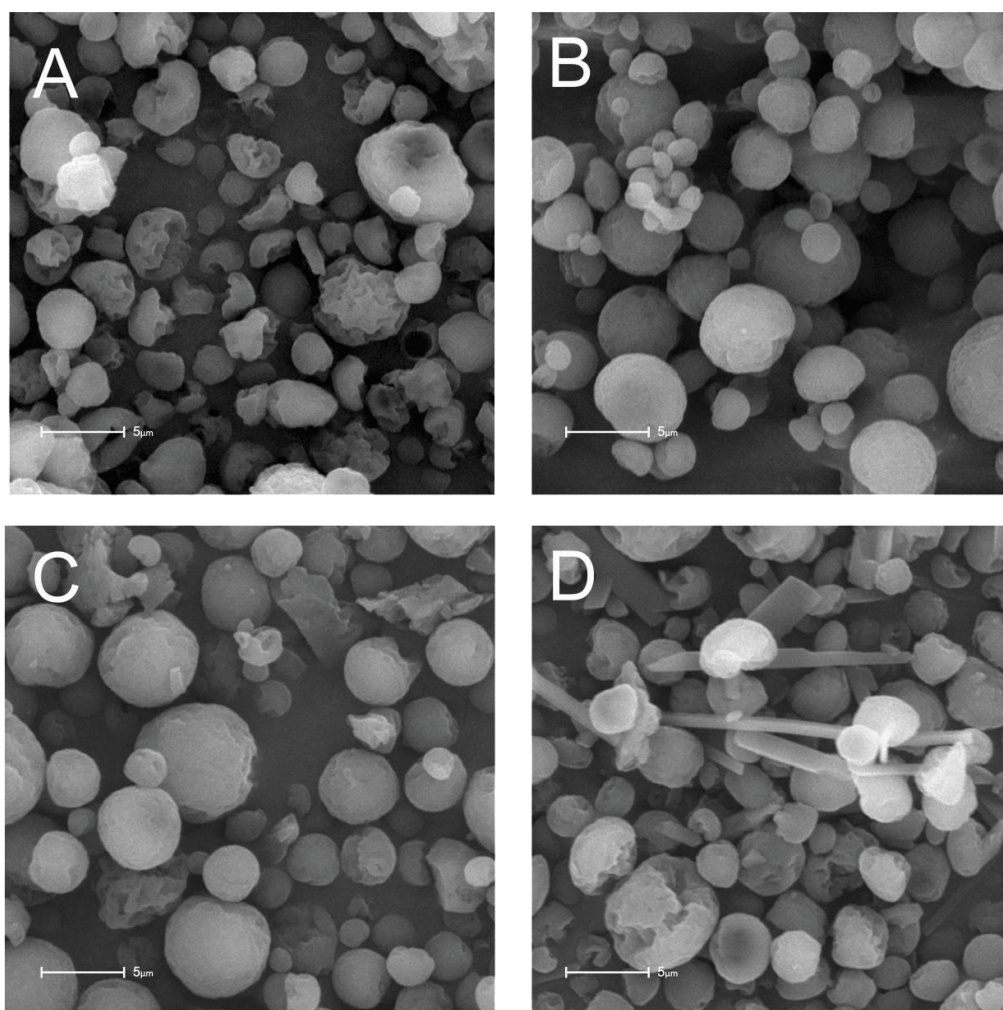


Fig. 2 Scanning electron micrographs of Eudragit[®] L100 microparticles: MFA0 (A), MFA5 (B), MFA10 (C), and MFA20 (D). Magnifications of 7.0 kX.

3.3 Particle size and granulometric distribution

The particle size and granulometric dispersion (span) obtained for Eudragit[®] L100 microparticles are indicated in Table 3. All formulations presented mean diameter values between 2 and 3 μm and span values lower than 2.

3.4 Fourier-transformed infrared spectroscopy

The FTIR spectra found for FA, Eudragit[®] L100, physical mixture and microparticles are shown in Figure 3. The FTIR spectrum for pure FA consisted of absorption bands of OH group stretching vibration (3442 cm^{-1}), aromatic and alkene C–H stretching vibrations (3018 cm^{-1}), alkane C–H stretching vibration (2972 cm^{-1}), aromatic conjugated C=O stretching vibration (1691 cm^{-1}), C=C aromatic stretching vibration ($1618, 1595, 1518, 1432\text{ cm}^{-1}$), C–O–C asymmetric stretching vibration (1277 cm^{-1}), and C–OH stretching vibration (1204 cm^{-1}). The FTIR spectrum for Eudragit[®] L100 presented a broadened band of OH stretching vibration ($3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$), an absorption band of aliphatic C–H stretching vibration ($3000\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$), and C=O stretching vibrations of ester group and carboxylic acid ($1740\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$). Band assignments for physical mixture corresponded simply to the superposition of the FTIR spectra for pure FA and Eudragit[®] L100. In general, the FTIR spectra of FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles showed typical infrared absorption bands of raw materials, mainly from Eudragit[®] L100 (Figure 3). However, the FTIR spectra of these formulations also demonstrated shift and broadening of OH stretching band and shift of C=O stretching band in comparison with physical mixture.

3.5 X-ray powder diffraction

Figure 4 shows XRPD patterns of FA, Eudragit[®] L100, physical mixture and microparticles. Pure FA presented different peaks, which were related to its crystalline structure, mainly at $2\theta = 9.02, 12.86, 15.62, \text{ and } 26.46^\circ$. On the other hand, Eudragit[®] L100 revealed a non-crystalline pattern. A decrease in the crystalline peaks, which was typical of FA, was observed in physical mixture. However, no crystalline peaks of FA were detected in all formulations since the microparticles revealed a similar XRPD pattern to pure Eudragit[®] L100.

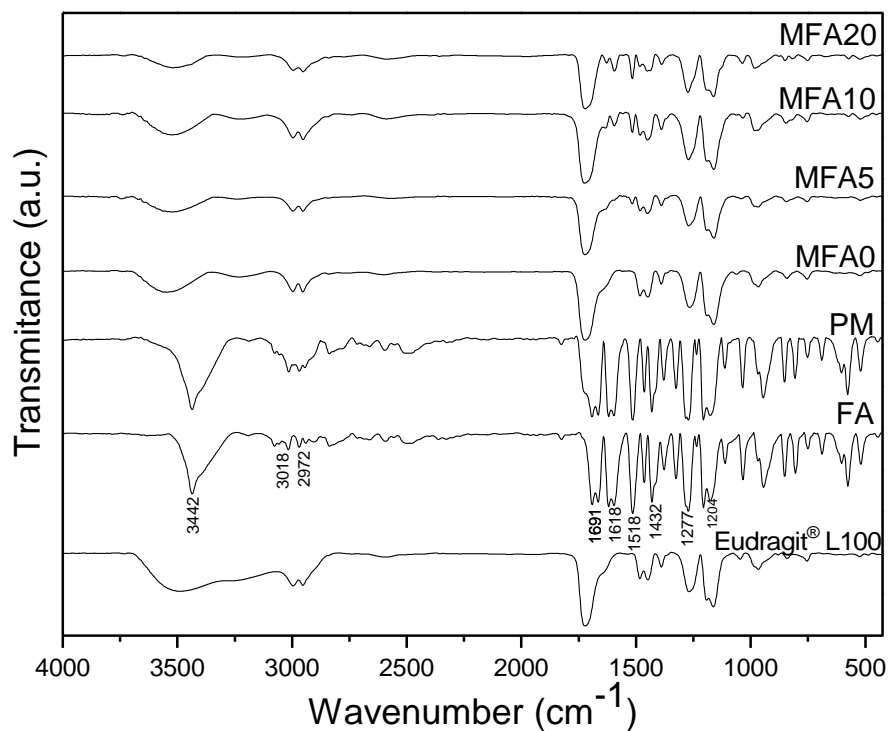


Fig. 3 FTIR spectra of FA, Eudragit® L100, physical mixture (PM) and microparticles (MFA0, MFA5, MFA10 and MFA20)

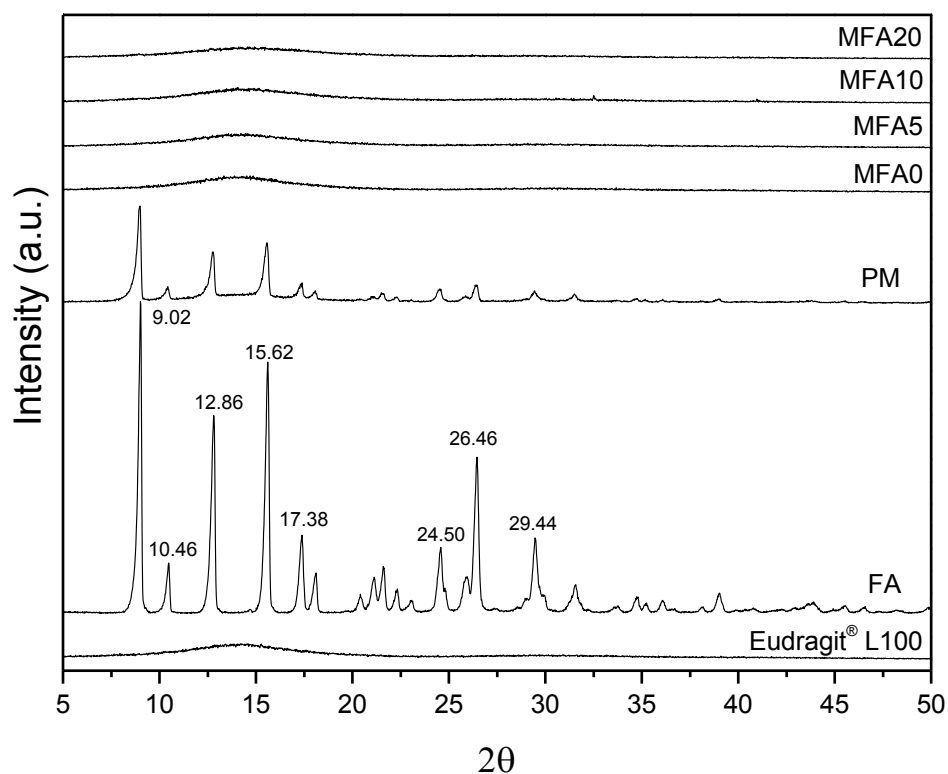


Fig. 4 XRPD patterns of FA, Eudragit® L100, physical mixture (PM) and microparticles (MFA0, MFA5, MFA10 and MFA20)

3.6 Thermal analyses

3.6.1 Thermogravimetric analysis

Figure 5 summarizes the steps of thermal degradation verified for unloaded and FA-loaded Eudragit® L100 microparticles. Formulations displayed a three-stage thermal decomposition profile. The first stage of weight loss was associated with water loss. The second and third stages were attributed to a combination of polymer chain and drug degradation and volatilization of their decompositions products, respectively. Moreover, thermograms indicated that the onset decomposition temperature of all microparticles was above 145 °C (MFA0 = 178.4 °C; MFA5 = 168.5 °C; MFA10 = 166.1 °C; MFA20 = 148.1 °C) under N₂ flux.

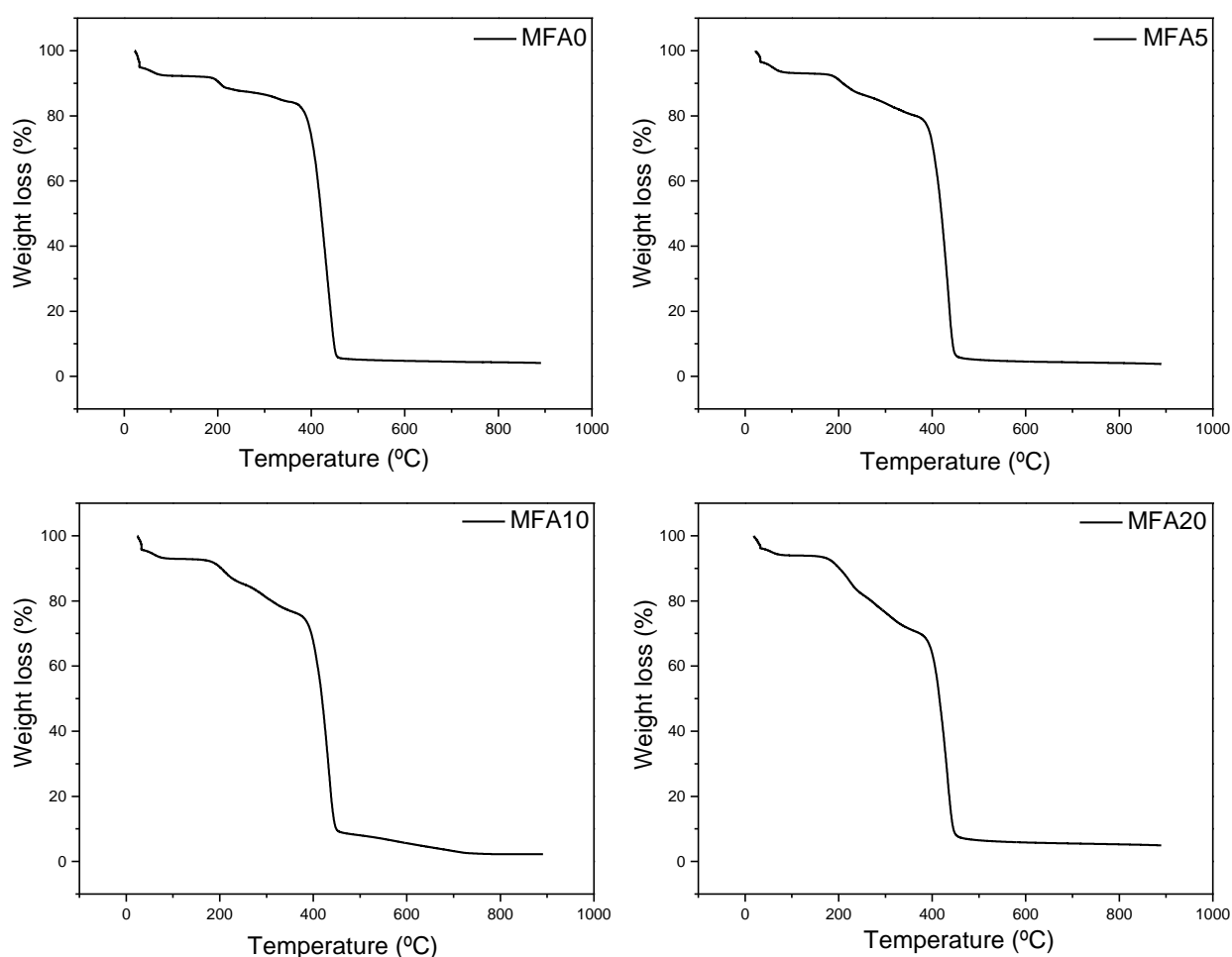


Fig. 5 TGA curves of microparticles MFA0, MFA5, MFA10 and MFA20.

3.6.2 Differential scanning calorimetry

The DSC curves performed for pure FA, Eudragit® L100, physical mixture (1:1) and Eudragit® L100 microparticles are displayed in Figure 6. Thermal profile of FA

showed an endothermic T_{\max} at 175.2 °C, which corresponded to the melting range of crystalline drug, as previously reported [23]. The typical melting event of FA was not observed in the DSC curves of FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles. This thermal behavior suggests that an amorphization of the drug occurred. This result was reinforced by the XRPD patterns, in which no crystalline peak of FA was observed for drug loaded-microparticles.

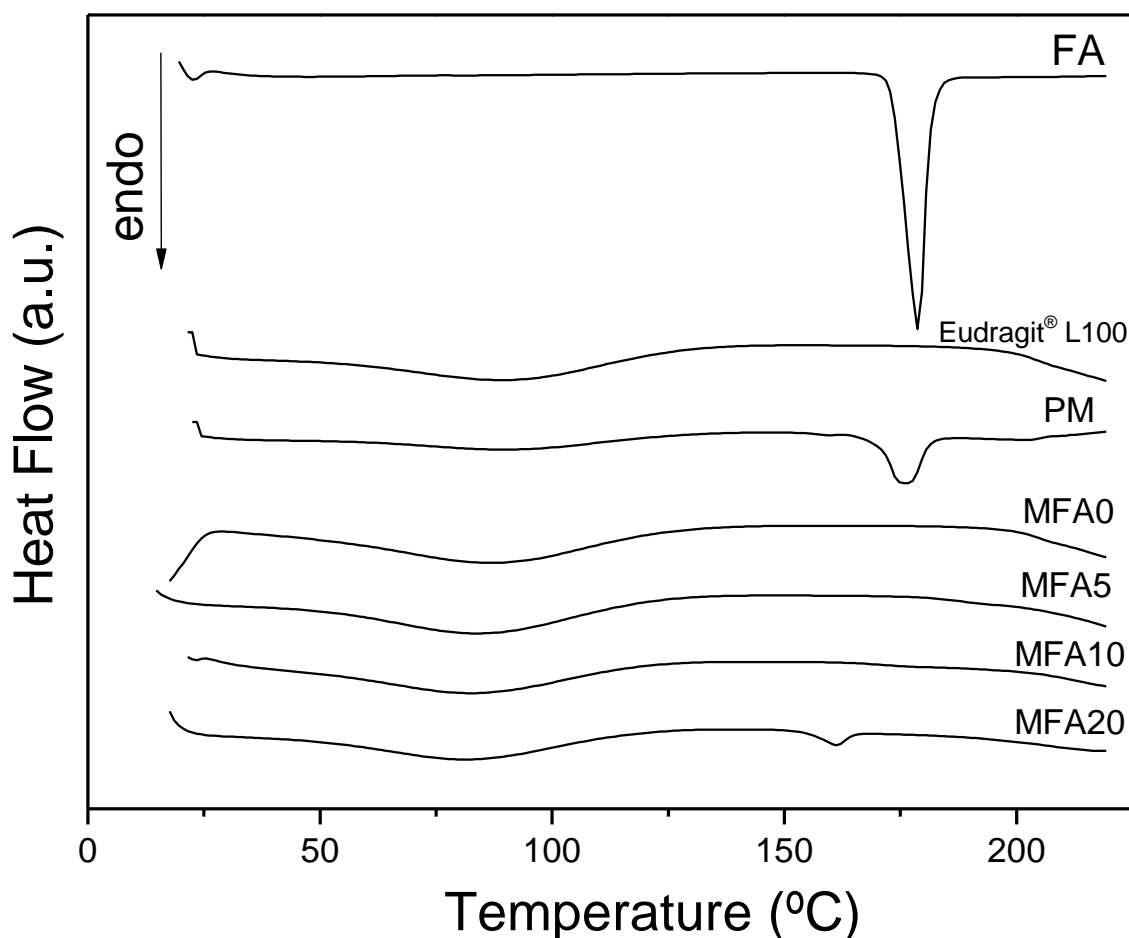


Fig. 6 DSC curves of FA, Eudragit[®] L100, physical mixture (PM) and microparticles (MFA0, MFA5, MFA10 and MFA20).

3.7 *In vitro* drug release and analysis of release behavior

The dissolution profiles of FA and FA-loaded microparticles are depicted in Figure 7. An 80% release of pure drug was obtained in 12.69 minutes. However, Eudragit[®] L100 microparticles showed mean dissolution times of 54 min (MFA5), 50.5 min (MFA10) and 17.50 min (MFA20) for 80% drug release. Therefore, FA-loaded microparticles demonstrated a slower dissolution rate than pure drug.

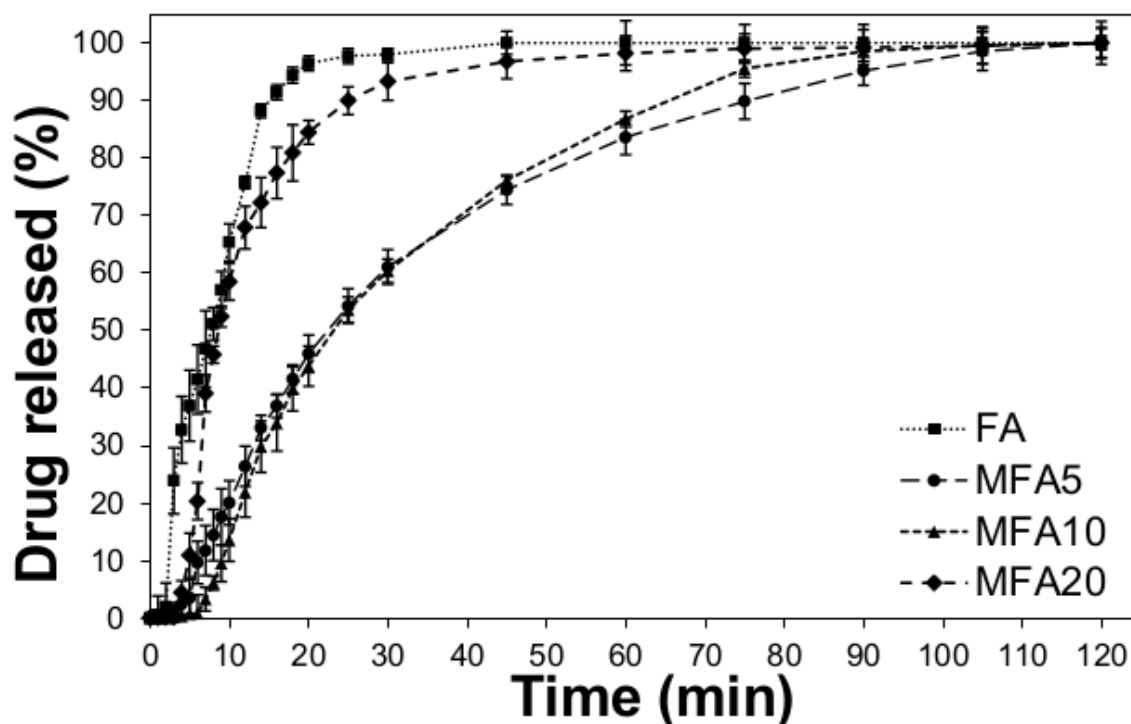


Fig. 7 *In vitro* release profiles of FA and FA-loaded microparticles into phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)

3.7.1 Analysis of Release Behavior

Regarding the dissolution efficiency, a value of 91.21% was calculated for pure drug after 2 h, while Eudragit[®] L100 microparticles showed 68.43% (MFA5), 74.72% (MFA10), and 78.84% (MFA20) at the same time interval. In order to investigate differences between release profiles, Tukey's *post hoc* test was performed on ANOVA results. This analysis indicated a statistically significant difference between pure drug and MFA5 ($P = 0.0013$) and MFA10 ($P = 0.0006$). However, pure FA and MFA20 showed no statistical difference ($P = 0.3608$).

The release profiles were adjusted to mathematical models and the selection of the best model was made by considering the factors of r , MSC and graphic adjustment. Spray-dried FA microparticles were better fitted to the monoexponential equation (Table 4) than other models.

Table 4 Release data obtained by fitting the dissolution profiles of pure ferulic acid and microparticles to monoexponential equation

Material	Monoexponential model		
	MSC	<i>R</i>	K (min ⁻¹)
Ferulic acid (FA)	2.89	0.9905	0.1050
MFA5	3.93	0.9975	0.0288
MFA10	2.84	0.9931	0.0270
MFA20	2.39	0.9773	0.0740

3.8 *In vitro* cell culture-based assays

In order to explore whether spray-dried FA microparticles had a cytotoxic effect on the J774A.1 cell line an MTT assay was initially performed. The results of MTT experiments (Figure 8, A) demonstrated the absence of cytotoxicity for free FA and MFA10 formulation in relation to J774A.1 after 48 h at concentrations ranging from 25 to 200 μ M. In addition, both pure drug and MFA10 microparticles induced statistically significant cell proliferation at 200 μ M compared to the control.

Cytoprotection against H₂O₂-induced oxidative stress in J774A.1 cells was investigated for FA and MFA10 formulation (Figure 8, B). Pure drug provided a non-significant cytoprotection ($p < 0.05$) in relation to H₂O₂ treatment. On the other hand, MFA10 microparticles significantly prevented H₂O₂-induced cell death at 50, 100 and 200 μ M compared to the control, which increased cell viability to 80.5 ± 2.3 , 128.5 ± 9.5 and $138.8 \pm 10.3\%$, respectively.

Concerning NO assay, LPS-induced nitrite production was measured in supernatant of cultured J774A.1 cells after treating them with FA and the MFA10 formulation. The results are shown in Figure 8, C. At 50 μ M, no significant effect was observed for pure drug and MFA10 microparticles. However, both free FA and MFA10 formulation significantly inhibited NO production, measured as nitrite in LPS-activated J774A.1 cells at 100 μ M compared to the control.

The ability of pure drug and MFA10 microparticles to avoid intracellular oxidant production in J774A.1 cells was assessed using DCFH-DA fluorescence (Figure 8, D). Fluorescence intensity statistically decreased after 24 h exposure to free FA at 100 μ M compared to the control. However, MFA10 formulation provided a significant

reduction in intracellular ROS production, even at a low concentration (50 μ M), reaching a decrease of 38.8% in fluorescence intensity (compared to control) at 100 μ M.

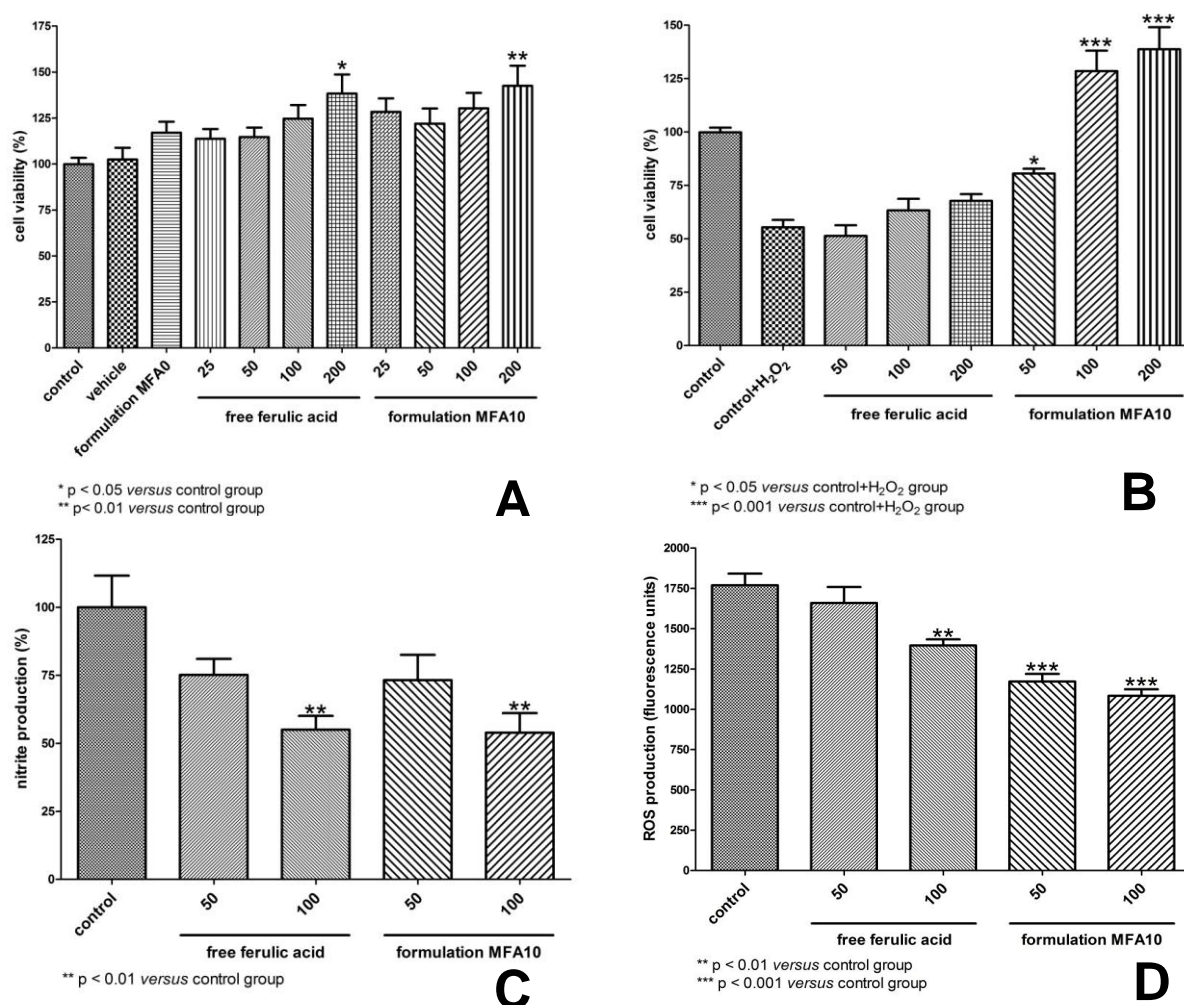


Fig. 8 Results of *in vitro* cell culture-based assays for free FA and formulation MFA10 using J774A.1 cell line. **A** Cell viability measured using MTT assay after 48 h of incubation. **B** Cytoprotection against H_2O_2 -induced oxidative stress. **C** LPS-induced nitrite production by J774A.1 cells measured after 24 h of incubation. **D** Intracellular ROS production in J774A.1 cells using DCFH-DA fluorescence. Each bar represents mean \pm standard error of mean from at least 6 independent experiments. Asterisks denote significance levels compared to control: significantly different, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, Tukey's test.

3.9 *In vivo* platelet aggregation test

The *in vivo* effect of MFA10 FA-loaded Eudragit® L100 microparticles on the inhibition of collagen-stimulated platelet aggregation was performed 6 h after the last administered dose and is shown in Figure 9. MFA0 microparticles were used as control and provided no inhibition of platelet aggregation. MFA10 formulation and aspirin presented a statistically significant anti-platelet effect compared to the control. However, pure FA had no significant effect on the inhibition of platelet aggregation compared to the control.

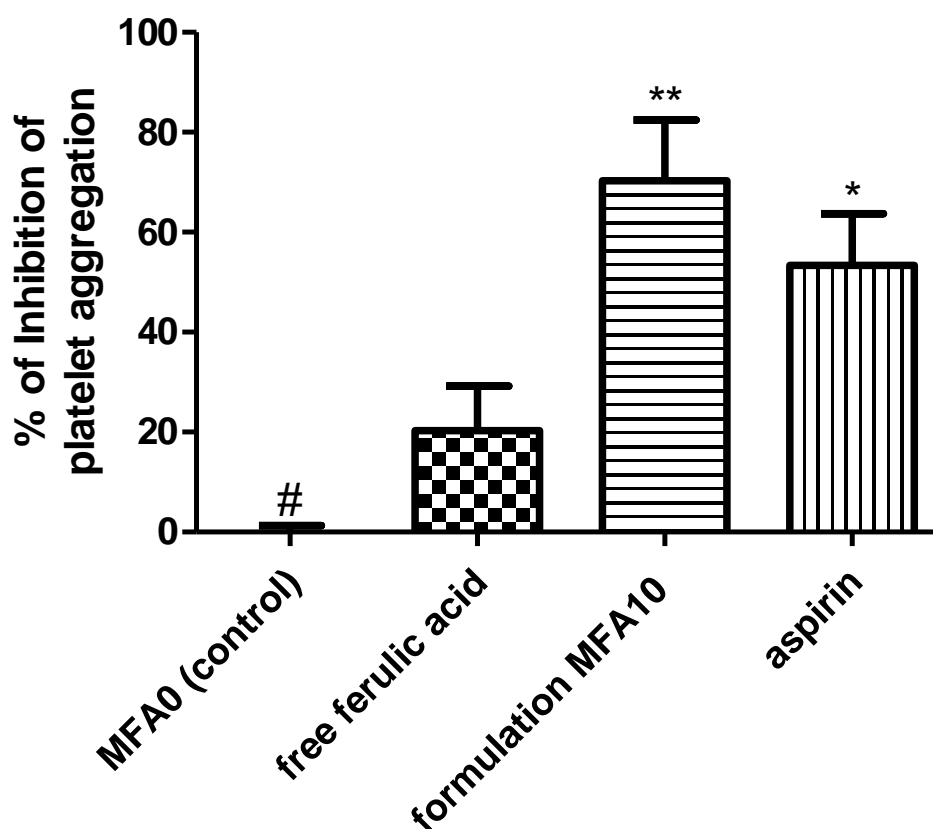


Fig. 9 Percentage of inhibition of platelet aggregation of MFA0 (control), free FA, formulation MFA10 and aspirin. Each bar represents mean \pm standard error of mean from 8 independent experiments. Asterisks denote significance levels compared to control: significantly different, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Bonferroni's test

4. DISCUSSION

This study demonstrates that FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles were successfully obtained by spray-drying. In general, these formulations showed feasible physicochemical properties in relation to oral use as a drug delivery system. Regarding moisture, the residual water content was determined for unloaded and drug-loaded microparticles. These data demonstrated that spray-drying process was able to remove 50/50 (v/v) of the water–ethanol solvent used during microencapsulation. Residual moisture in microparticles is an important indicator of drying efficiency and it can influence flow properties, compressability, tendency to agglomerate, and stability [24,25]. In that sense, a low water content, which is similar to raw materials, ensures a suitable quality for the proposed use.

Regarding the issue of drug microencapsulation, a high drug-loading efficiency (near to 100%) was obtained for FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles using a previously validated HPLC method. Similar or lower results were previously reported for nanoparticles containing this drug. FA-loaded nanoparticles prepared using Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA) (Mw 40.000–75.000 g.mol⁻¹) presented an EE of 76% [6]. Stearic acid- and stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles containing *E*-FA revealed a loading efficiency of 95.4 and 97.7%, respectively [13]. These differences are basically related to the chosen microencapsulation procedure. This paper is the first to report the use of spray-drying for obtaining FA-loaded polymeric microparticles. During this drying process solvent evaporation is rapid and drug entrapment occurs quasi-instantaneously [26]. If no phase separation or segregation of drug or polymer occurs during drying then high encapsulation efficiency is typically obtained. In addition, it is a single-step, low-cost, easy to scale-up process [14] that does not involve organic solvents of high toxicity for microencapsulation, as compared to the usual solvent-based procedures of oil in water and oil in oil emulsification/solvent evaporation. Therefore, spray-drying offers high drug encapsulation and a number of advantages in relation to pharmaceutical microtechnology.

A suitable morphology and size distribution were observed for FA spray-dried microparticles. In general, microparticles retained their spherical shape or they presented some deformations due to their hollow structure, which collapsed and shriveled. This behavior is typical of many spray-drying procedures [14, 27–28],

particularly considering the raw material that is used. If a particle is hollow it tends to shrivel and deform on complete drying [29]. Considering the factor of span, all microparticles had values less than 2, which indicated a narrow dispersion around the mean [30]. In addition, these micrometer-sized particles can provide a prolonged effect of FA, since they can present an extended intestinal transit [31–32].

The FTIR spectra for FA and Eudragit[®] L100 corresponded to what has been previously reported in the literature [33, 1]. The drug-loaded microparticles demonstrated broadening and shifts involving OH and C=O bands. This result suggests that intermolecular O–H•••C=O bonds were formed between FA and Eudragit[®] L100 after spray-drying procedure. Sahoo et al. [34] previously observed that hydrogen bonding has a significant influence on band shape and intensity, generally causing band broadening and shifts similar to our findings, which can lead to a better controlled release. Furthermore, XRPD patterns and DSC curves confirmed drug amorphization during microencapsulation due to an absence or a remarkable decrease of crystalline diffraction peaks and melting event of FA, respectively. In general, amorphous solids are more soluble than crystalline forms due to the free energies involved in dissolution process. Solids in amorphous state have randomly arranged molecules and thus low energy is required to separate them. Consequently, their dissolution is faster than when in crystal form [35]. This behavior is particularly desirable for FA because it is a drug of low water solubility, which can improve its dissolution profile. Moreover, thermal degradation was registered over 145 °C under N₂ flux by TGA, which indicates that unloaded and drug-loaded microparticles presented a suitable thermal stability.

The *in vitro* drug release experiments showed that Eudragit[®] L100 played an important role in delaying the dissolution of FA. In addition, MFA5 (5% ferulic acid) and MFA10 (10% ferulic acid) formulations presented statistically slower release than pure FA. The higher amount of polymer in these formulations probably provided an enhanced effect in controlling drug release rate. Eudragit[®] L100 is a methacrylic polymer that is widely used in oral drug delivery systems. Eudragit[®] L100 is a pH-responsive polymer whose dissolution threshold is pH 6.0 [14]. In that sense, dissolution test of the prepared spray-dried microparticles at pH 7.0 illustrated polymer-controlled drug release.

In order to investigate the potential *in vitro* and *in vivo* effects of FA spray-dried microparticles, MFA10 formulation was chosen for further assays due to its

appropriate morphology and size, higher drug loading and encapsulation efficiency, suitable molecular dispersion of the drug into a polymeric matrix, and a controlled release pattern.

First of all, cytotoxicity of free FA and MFA10 formulation was tested in relation to J774A.1 tumor cells using the MTT method. MTT assay is widely used for evaluating cytotoxicity of potential medicinal agents, since these substances can stimulate or inhibit cell viability and growth. MTT is a yellow tetrazole that is reduced to purple formazan, based on the activity of mitochondrial/non-mitochondrial dehydrogenase enzymes in viable cells. Insoluble purple formazan product is then dissolved into a colored solution and spectrophotometrically determined [36–38]. Our results showed that both free FA and MFA10 microparticles had no cytotoxic effect on J774A.1 cells. Therefore, there was no change in the enzymatic activity of dehydrogenase that led to no cell death. On the other hand, free FA and MFA10 formulation increased cell viability at 200 μ M, which led to interest in investigating a potential cytoprotective effect due to the well-known antioxidant effect [39] of FA.

In cytoprotective assay, J774A.1 cells were exposed to free FA and MFA10 formulation for 48 h, followed by a 600 μ M H_2O_2 treatment in order to induce oxidative stress. The *in vitro* potential of pure drug and FA spray-dried microparticles to reverse this deleterious damage to cells was also evaluated by an MTT assay. In that case, only MFA10 formulation was able to avoid H_2O_2 -induced oxidative damage in J774A.1 cells. Oxidative stress occurs when the cellular homeostasis, which normally involves a fine balance between free radical generation and their detoxification by antioxidants, is disturbed [40]. H_2O_2 is well known to act as a potent inducer of reactive oxygen species (ROS) and it is capable of inducing cell injury both *in vitro* and *in vivo* [41,42]. H_2O_2 is particularly known to induce oxidative damage, leading to lipid peroxidation, ROS generation, depletion in reduced glutathione, and reduction in antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) activity preceding cell death [43,44]. Compared to free drug, only FA spray-dried microparticles demonstrated a cytoprotective effect that can be related to a long-lasting antioxidative mechanism assigned to FA released from this formulation which was accounted for providing a controlled drug release pattern. This antioxidative mechanism is deeply related to FA chemical structure and can be supported by two major routes: non-enzymatic and enzymatic processes. This substance can reduce cell damage by protection against oxidative damage through

non-enzymatic scavenging of ROS including H_2O_2 . Bioactivities of phenolic acids, non-enzymatic agents, are known to be closely related to their molecular structure containing hydroxyl, aromatic groups and/or double bonds [45]. In particular, FA presents labile phenolic hydrogen atoms joined to a completely conjugated system. This chemical structure leads to formation of more stable and low energy products from ROS molecules and gives additional properties in terms of the interruption of chain reactions of free radicals [2]. The presence of unsaturation in side chain of FA provides sites for attack by free radicals. The carboxylic acid group can allow an interaction with lipid bilayer of cell membrane which provides protection against lipid peroxidation [2, 46]. Moreover, FA can play a role as antioxidant by an enzymatic mechanism for cell defense. This phenolic compound also presents effects related to the inhibition of cytotoxic enzymes as inducible nitric oxide synthase, caspases and cyclooxygenase-2. These activities contribute to its well-known antioxidant and anti-inflammatory effects [7,11,23]. Thus, it is possible to suggest that FA-loaded Eudragit® L100 microparticles offer a feasible system to provide cytoprotection as a result of keeping its antioxidant effect for a prolonged time interval.

An inflammatory stimulus such as LPS can activate J774A.1 murine macrophages to produce a variety of inflammatory mediators, including prostaglandin E_2 and NO [47]. LPS-activated macrophages express transcriptionally inducible nitric oxide synthase, which produces high amounts of NO from L-arginine [48]. Substances that can inhibit NO production have potential as anti-inflammatory and immunomodulatory drugs [37]. Both free FA and FA spray-dried microparticles at 100 μM provided a statistically significant reduction of NO as nitrite production. This result can pave the way for investigating the *in vivo* anti-inflammatory potential and immunomodulatory activity of FA-loaded Eudragit® L100 microparticles.

2',7'-Dichlorofluorescein and its diacetate form DCFH-DA are widely used to measure oxidative stress in cells due to the high sensitivity of fluorescence-based assays. The assay consists of the oxidation of DCFH (after hydrolysis of the diacetate form) to fluorescein by ferryl-type intermediates and/or oxygen and nitrogen reactive species (ROS/RNS), whose fluorescence can be measured at 522 nm [49]. Therefore, this assay can be useful for quantifying intracellular ROS/RNS production in order to explore an antioxidant effect. Our results showed that spray-dried FA microparticles provided a better effect than pure FA in reducing intracellular ROS/RNS production even at a low concentration (50 μM). This effect can be also

attributed to the controlled release pattern of MFA10 formulation and it reinforces the cytoprotective results.

Anti-platelet aggregation drugs are used as mainstream first-line drugs for prevention and cure of arterial thrombus diseases [50]. FA and its derivatives are well-known as anti-platelet agents because they can activate blood circulation to dissipate blood stasis. However, this clinical effect is rapid because FA can be intensively metabolized by liver and gut microflora undergoing hydrogenation of α , β -unsaturated bond, demethylation, and selective dehydroxylation at C4 to form a plethora of related phenolic metabolites [51]. Our results demonstrated that free FA showed no statistical effect compared to the control (MFA0 formulation) 6 h after the last administered dose. However, MFA10 formulation provided a more appropriate anti-platelet effect, which was even superior to aspirin, a gold standard anti-platelet agent [52]. FA spray-dried microparticles probably inhibited platelet aggregation for a longer time interval by controlling the rate of drug release. These results demonstrate that FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles can provide a prolonged *in vivo* anti-platelet activity for FA and should be studied further as a new polymeric carrier to treat arterial thrombus diseases.

5. CONCLUSION

FA-loaded Eudragit[®] L100 microparticles were successfully prepared by a spray-drying method. Micrometer-sized, heat-stable and amorphous/non-crystalline formulations with high drug-loading efficiencies were obtained. Intermolecular O–H...C=O bonds between FA and Eudragit[®] L100 were recorded by FTIR for spray-dried formulations after microencapsulation procedure. MFA5 and MFA10 formulations provided a statistical decrease in the dissolution rate of FA and maintained the initial monoexponential kinetic model. These results support an experimental basis for the use of these multiple unit dosage forms as a promising approach for prolonging drug release. In addition, microencapsulation of FA provided cytoprotection against H₂O₂-induced oxidative stress and inhibited collagen-stimulated platelet aggregation. In summary, these formulations are feasible carriers for the controlled release of FA and can be used in other innovative oral products intended for antioxidant, cytoprotective and antithrombotic effects.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

The authors are grateful to CAPES/Brazil and Fundação Araucária/Brazil for financial support. They would also like to thank the Complexo de Laboratórios Multiusuários, which is a multi-user laboratory of analytical equipments and facilities at State University of Ponta Grossa, for providing infrastructure, constant support and encouragement.

REFERENCES

- [1] J. Wang, Y. Cao, B. Sun, C. Wang, Characterization of inclusion complex of *trans*-ferulic and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, *Food Chem.*124 (2011) 1069–1075.
- [2] S. Itagaki, T. Kurokawa, C. Nakata, Y. Saito, S. Oikawa, M. Kobayashi, T. Hirano, K. Iseki, *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors, *Food Chem.* 114 (2009) 466–471.
- [3] A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, A. Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, F. Bonina, *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents, *Int. J. Pharm.*199 (2000) 39–47.
- [4] Z. Zhao, M.H. Moghadasian, Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review, *Food Chem.* 109 (2008) 691–702.
- [5] F.M. Roleira, C. Siquet, E. Orrù, M. Garrido, J. Garrido, N. Milhazes, G. Podda, F. Paiva-Martins, S. Reis, R.A. Carvalho, E.J.T. Silva, F. Borges, Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties, *Bioorg. Med. Chem.*18 (2010) 5816–5825.
- [6] J.P.J. Merlin, N.R. Prasad, S.M.A. Shibli, M. Sebeela, Ferulic acid loaded Poly-*d,l*-lactide-co-glycolide nanoparticles: Systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line *in vitro*, *Biomed Prev Nutr.*2 (2012) 69–76.
- [7] V. Staniforth, W-C. Huang, K. Aravindaran, N-S. Yang, Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrixmetalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms, *J Nutr Biochem.*23 (2012) 443–451.
- [8] N. Du, S. Cao, Y. Yu, Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 1697–1703.

- [9] D-G. Yu, J-M. Yang, C. Branford-White, P. Lu, L. Zhang, L-M. Zhu, Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers, *Int. J. Pharm.* 400 (2010) 158–164.
- [10] S. Scalia, M. Mezzena, Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical-stability, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 90–94.
- [11] C. Anselmi, M. Centini, M. Maggiore, N. Gaggelli, M. Andreassi, A. Buonocore, G. Beretta, R.M. Facino, Non-covalent inclusion of ferulic acid with alfa-cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies, *J Pharmaceut Biomed.* 46 (2008) 645–652.
- [12] S. Woranuch, R. Yoksan, Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan, *Carbohydr Polym.* 96 (2013) 495–502.
- [13] S. Trombino, R. Cassano, T. Ferrarelli, E. Barone, N. Picci, C. Mancuso, *Trans*-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes, *Colloids Surf., B* 109 (2013) 273–279.
- [14] K. Rizi, R.J. Green, M. Donaldson, A.C. Williams, Production of pH-responsive microparticles by spray drying: investigation of experimental parameter effects on morphological and release properties, *J. Pharm. Sci.* 100(2) (2011) 566–579.
- [15] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- [16] J.M. Nadal, M.G. Toledo, Y.M. Pupo, J.P. de Paula, P.V. Farago, S.M.W. Zanin, A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency, *J Anal Methods Chem.* 2015 (2015) 1–10.
- [17] E. Lima, J. Flores, A.S. Cruz, G. Leyva-Gómez, E. Krötzsch, Controlled release of ferulic acid from a hybrid hydrotalcite and its application as an antioxidant for human fibroblasts, *Micropor Mesopor Mat.* 181 (2013) 1–7.
- [18] K.A. Khan, The concept of dissolution efficiency, *J. Pharm. Pharmacol.* 27(1) (1975) 48–49.
- [19] R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, E.V. Benvenuti, T.D. Costa, S.S. Guterres, Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological characterization, *in vitro* release and *in vivo* gastrointestinal tolerance, *J. Braz. Chem. Soc.* 16(6) (2005) 1233–1240.
- [20] J. Siepmann, N.A. Peppas, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48(2-3) (2001) 139–157.

- [21] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*. 65 (1-2) (1983) 55–63.
- [22] A.H. Ding, C.F. Nathan, D.J. Stuehr, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J. Immunol*. 141 (1988) 2407–2412.
- [23] C. Anselmi, M. Centini, M. Ricci, A. Buonocore, P. Granata, T. Tsuno, R.M. Facino, Analytical characterization of a ferulic acid/gama-cyclodextrin inclusion complex, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 875–881.
- [24] A.L.R. Rattes, W.P. Oliveira, Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles, *Powder Technol.* 171(1) (2007) 7–14.
- [25] C. Bosquillon, P.G. Rouxhet, F. Ahimou, D. Simon, C. Culot, V. Pr  at, R. Vanbever, Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders, *J Control Release*. 99 (2004) 357–367.
- [26] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel, Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Res Int*. 40(9) (2007) 1107–1121.
- [27] E. Esposito, R. Roncarati, R. Cortesi, F. Cervellati, C. Nastruzzi, Production of Eudragit microparticles by spray drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics, *Pharm. Dev. Technol.* 5(2) (2000) 267–278.
- [28] B.P. Rao, R. Mathews, K.P. Krishna, B. Baby, Poornima, Spray-dried gastroretentive floating microparticles: Preparation and *in vitro* evaluation, *Pak. J. Pharm. Sci.* 26(4) (2013) 707–713.
- [29] D.E. Walton, The Morphology of spray-dried particles: a qualitative view, *Dry Technol.* 18(9) (2000) 1943–1986.
- [30] P.V. Farago, R.P. Raffin, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, S.F. Zawadzki, Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique, *J. Braz. Chem. Soc.* 19(7) (2008) 1298–1305.

- [31] M.P. Desai, V. Labhasetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size, *Pharmaceut Res.* 13(12) (1996) 1838–1845.
- [32] F.M. Barboza, W.M. Machado, L.R.J. Olchanheski, J.P. de Paula, S.F. Zawadzki, D. Fernandes, P.V. Farago, PCL/PHBV Microparticles as innovative carriers for oral controlled release of manidipine dihydrochloride, *ScientificWorldJournal*. 2014 (2014) 1–10.
- [33] S.E. Sajjadi, Y. Shokoohinia, N.S. Moayedi, Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima* Mozaff, *Jundishapur J Nat.* 7(4) (2012) 159–162.
- [34] S. Sahoo, C.K. Chakraborti, P.K. Behera, S.C. Mishra, FTIR and Raman spectroscopic investigations of a norfloxacin/carbopol934 polymeric suspension, *J Young Pharm.* 4(3) (2012) 138–145.
- [35] H.K. Stulzer, M.P. Tagliari, A.L. Parize, M.A.S. Silva, M.C.M. Laranjeira, Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying, *Mat Sci Eng C-Bio S.* 29(2) (2009) 387–392.
- [36] M.V. Berridge, A.S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1993) 474–482.
- [37] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63.
- [38] P.M. Döll-Boscardin, M.A. Almeida, T. Nakashima, J.F.P. de Paula, C.C. Kanunfre, P.V. Farago, Essential oil from *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambag reduces nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced murine peritoneal macrophages, *Lat. Am. J. Pharm.* 31(4) (2012) 545–548.
- [39] P. Picone, D. Nuzzo, M. Di Carlo, Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric A-beta on sea urchin embryo, *Biol. Bull.* 224 (2013) 18–28.
- [40] K. Dhuna, V. Dhuna, G. Bhatia, J. Singh, S.S. Kamboj, Cytoprotective effect of methanolic extract of *Nardostachys jatamansi* against hydrogen peroxide induced oxidative damage in C6 glioma cells, *Acta Biochim Pol.* 60(1) (2013) 21–31.

- [41] H.S. Kim, K. Lee, K.A. Kang, N.H. Lee, J.W. Hyun, Phloroglucinol exerts protective effects against oxidative stress-induced cell damage in SH-SY5Y cells, *J Pharmacol Sci.* 119 (2012) 186–192.
- [42] M. Terashvili, P. Sarkar, M.V. Nostrand, J.R. Falck, D.R. Harder, The protective effect of astrocyte-derived 14,15-epoxyeicosatrienoic acid on hydrogen peroxide-induced cell injury in astrocyte-dopaminergic neuronal cell line co-culture, *Neurosci.* 223 (2012) 68–76.
- [43] S. Brenner, M. Gulden, E. Maser, H. Seibert, Lasting effect of preceding culture conditions on the susceptibility of C6 cells to peroxide-induced oxidative stress, *Toxicol In Vitro.* 24 (2010) 2090–2096.
- [44] M. Gulden, A. Jess, J. Kammann, E. Maser, H. Seibert, Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time, *Free Radic Biol Med.* 49 (2010) 1298–1305.
- [45] N. Moriguchi, E. Hinoi, Y. Tsuchihashi, S. Fujimori, M. Iemata, T. Takarada, Y. Yoneda, Cytoprotection by pyruvate through an anti-oxidative mechanism in cultured rat calvarial osteoblasts, *Histol Histopathol.* 21 (2006) 969–977.
- [46] M. Srinivasan, A.R. Sudheer, V.P. Menon, Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property, *J Clin Biochem Nutr.* 40 (2007) 92–100.
- [47] D.A. Geller, T.R. Billiar, Molecular biology of nitric oxide synthases, *Cancer Metast. Rev.* 17 (1998) 7–23.
- [48] R. Zamora, Y. Vodovotz, T.R. Billiar, Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.* 6 (2000) 347–73.
- [49] M.G. Bonini, C. Rota, A. Tomasi, R.P. Mason. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy?, *Free Radical Bio Med.* 40 (2006) 968–975.
- [50] S.R. Steinhubl, P.B. Berger, J.T. Mann III, Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial, *JAMA.* 288(19) (2002) 2411–2420.
- [51] P-X. Zhang, H. Lin, C. Qu, Y-P. Tang, N-G. Li, J. Kai, G. Shang, B. Li, L. Zhang, H. Yan, P. Liu, J-A. Duan, Design, synthesis, and *in vitro* antiplatelet aggregation activities of ferulic acid derivatives, *J Chem.* 2015 (2015) 1–7.
- [52] K. Schrör, Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis, *Semin Thromb Hemost.* 23(4) (1997) 349–356.

APÊNDICE 3 - MANUSCRITO 3**SPRAY-DRIED SOLID DISPERSIONS CONTAINING FERULIC ACID:
COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE CARRIERS, *IN VITRO* DISSOLUTION,
ANTIOXIDANT POTENTIAL AND *IN VIVO* ANTI-PLATELET EFFECT**

Artigo aceito para publicação no periódico *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2016.

Doi: 10.3109/03639045.2016.1173055

**Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: comparative analysis of
three carriers, *in vitro* dissolution, antioxidant potential and *in vivo* anti-platelet
effect**

Jessica Mendes Nadal^a, Mona Lisa Simionatto Gomes^a, Débora Maria Borsato^b,
Martinha Antunes Almeida^c, Fernanda Malaquias Barboza^b, Sônia Faria Zawadzki^c,
Paulo Vitor Farago^{*b} and Sandra Maria Warumby Zanin^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Brazil

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Brazil

^c Postgraduate Program in Chemistry, Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Brazil

*Address correspondence to this author at the State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil;
Tel: +55 42 32203115; Fax: +55 42 32203102;
E-mail: pvfarago@gmail.com

ABSTRACT

This paper aimed to improve the relative solubility and dissolution rate of ferulic acid (FA) by the use of spray-dried solid dispersions (SDs) in order to ensure its *in vitro* antioxidant potential and to enhance its *in vivo* anti-platelet effect. These SDs were prepared by spray-drying at 10 and 20% of drug concentration using polyvinylpyrrolidone K30 (PVP-K30), polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) and poloxamer-188 (PLX-188) as carriers. SDs and physical mixtures were characterized by SEM, XRPD, FTIR spectroscopy and TGA analysis. Spray-dried SDs containing FA were successfully obtained. Relative solubility of FA was improved with increasing carrier concentration. PVP-K30 and PEG 6000 formulations showed suitable drug content values close to 100% whereas PLX-188 presented mean values between 70 and 90%. Agglomerates were observed depending on the carrier used. XRPD patterns and thermograms indicated that spray-drying led to drug amorphization and provided appropriate thermal stability, respectively. FTIR spectra demonstrated no remarkable interaction between carrier and drug for PEG 6000 and PLX-188 SDs. PVP-K30 formulations had changes in FTIR spectra which denoted intermolecular O–H•••O=C bonds. Spray-dried SDs played an important role in enhancing dissolution rate of FA when compared to pure drug. The free radical-scavenging assay confirmed that the antioxidant activity of PEG 6000 10% SDs was kept. This formulation also provided a statistically increased *in vivo* anti-platelet effect compared to pure drug. In summary, these formulations enhanced relative solubility and dissolution rate of FA and chosen formulation demonstrated suitable *in vitro* antioxidant activity and improved *in vivo* anti-platelet effect.

KEYWORDS: antioxidant, hydrophilic carrier, spray-drying, phytoalexin, platelet aggregation

1. INTRODUCTION

Oral route is the most convenient and commonly used for drug delivery due to its ease of administration, high patient compliance, cost effectiveness, least sterility constraints, and flexibility in the design of dosage form. However, the major challenge regarding oral dosage forms lies with their poor bioavailability. Oral bioavailability depends on several factors including aqueous solubility, drug permeability, dissolution rate, first-pass metabolism, presystemic metabolism, and susceptibility to efflux mechanisms. The most frequent causes of low oral bioavailability are attributed to poor drug solubility and low permeability.¹ In that sense, poor drug solubility remains one of the most challenging aspects of formulation development.^{2,3}

There are numerous approaches available and reported in literature to enhance solubility of poorly water-soluble drugs. These techniques are chosen on the basis of certain aspects such as properties of the drug under consideration, nature of excipients to be selected, and nature of intended dosage form.^{1,4}

Solid dispersions (SDs) represent a useful pharmaceutical technique for increasing dissolution, absorption, and therapeutic efficacy of drugs in dosage forms. Historically, the term “solid dispersion” was defined as a dispersion of drug in a solid matrix where this hydrophilic carrier was either a small molecule or polymer.⁵ These systems provide some possibility of (a) reducing particle size of drugs to (nearly) a molecular level, (b) locally increasing the saturation solubility and/or (c) transforming the drug from crystalline to (partially) amorphous state.¹

The most commonly used hydrophilic carriers for solid dispersions include polyvinylpyrrolidone (Povidone, PVP), polyethylene glycol (PEG), and copolymer of vinyl pyrrolidone and vinyl acetate (Plasdone-S630). In particular, PVP and PEG have shown the greatest use due to their water solubility, low cost, and ability to form solid solution in amorphous state.^{6,7} Surfactants such as polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween-80), docusate sodium, polyoxyethylene (40) stearate (Myrj-52), polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer (poloxamers, Pluronic-F68), and sodium dodecyl sulfate (SDS) also find a singular place in formulation of solid dispersion.¹ Recently, poloxamers have demonstrated promise to be carriers for preparation of solid dispersions because they have capability to alter physical

properties such as hydrophobicity, surface charge, flocculation/dispersion, floatation and wetting properties.⁷⁻¹⁰

Ferulic acid (FA; C₁₀H₁₀O₄; MW: 194.18 Da) or (*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid is an organic compound that is abundant in plants which has low toxicity and is synthesized from shikimate pathway via phenylalanine or L-tyrosine. In nature, it occurs mainly as a *trans* isomer.^{11,12} FA is one of the active components of Chinese medicinal herbs such as *Angelica sinensis*, *Cimicifuga heracleifolia* and *Lignstcum chuangxiong*. This drug possesses antioxidant, anti-inflammatory, anti-thrombosis, photoprotective, and antimicrobial properties, and suppresses proliferation of a wide variety of tumor cells.^{13,14} It also protects against coronary disease, lowers cholesterol and increases sperm viability.¹¹ Despite extensive research and development studies, poor solubility of FA in aqueous solution (6.63 mg.dL⁻¹ at pH 7.2) remains as a major barrier for its bioavailability and clinical efficiency.^{15,16}

To address this problem, there are few literature reports devoted to the investigation of solid dispersions containing FA. Solid inclusion complexes between FA and α - or γ -cyclodextrin were prepared by coprecipitation to obtain a water-soluble system that led to better aqueous solubility required for a cosmetic ingredient, increased photo-stability and improved skin delivery.^{17,18} Similarly, inclusion complex of FA with hydroxypropyl- β -cyclodextrin was obtained by freeze-drying and demonstrated to be a proper excipient for increasing solubility and stability of FA.¹¹ Solid dispersions of FA in composite nanofibers were prepared by electrospinning using PVP, SDS, and sucralose and exhibited a much faster dissolution rate and a 13-fold higher permeation rate across sublingual mucosa compared to pure FA.¹⁹ However, to the best of our knowledge, no previous work had demonstrated the viability of using spray-drying for obtaining solid dispersion containing FA. In addition, these papers lack evaluations of the *in vivo* effect of prepared solid dispersion which is crucial for purposing a clinical use.

Spray-drying is a highly reproducible, low-cost, and easy to scale up method for obtaining solid dispersions. Due to the large specific surface area offered by droplets, the solvent rapidly evaporates and a solid dispersion is formed within seconds, which may be fast enough to prevent phase separation. Moreover, solid dispersions prepared by spray-drying consist of particles of which size may be customized by changing the droplet size to meet the requirements for further

processing or application (e.g., free flowing particles or particles for inhalation). Spray-drying usually yields a drug in the amorphous state²⁰, however sometimes the drug may have (partially) crystallized during processing.²¹

In this context, the aim of this study was to compare three different types of carriers PVP-K30, PEG 6000 and Poloxamer-188 (PLX-188) to obtain spray-dried SDs containing FA in order to enhance the relative solubility and drug dissolution rate. In addition, the potential of SDs in maintaining antioxidant activity and in improving *in vivo* anti-platelet effect of FA was investigated.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Ferulic acid (FA, 99.80% pure, Suzhou Leader Chemical, Suzhou, China). Polyvinylpyrrolidone K30 (PVP-K30, M_w = 58.000 Da, Jiaozuo Meida Fine Chemical, Shanghai, China), Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, M_w = 5.000-7.000 Da, Fluka, St. Louis, MO, USA), Poloxamer-188 (PLX-188, M_w = 8.400 Da, BASF, Ludwigshafen, Germany) were used as received without any further purification. Ultra-pure water was obtained by Milli-Q[®] ultrapure water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Other reagents and solvents were of analytical or HPLC grade.

2.2 Preparation of solid dispersion

Solid dispersions were prepared by spray-drying method using PVP-K30, PEG 6000 or PLX-188 as carriers. These formulations were obtained at theoretical concentrations of 10 and 20% of FA. Previously, drug and carriers were sifted through a 60 mesh sieve. All formulations were prepared in triplicate from three different batches. Formulations containing no drug were used as negative controls.

Pure drug (FA) and carrier (PVP-K30, PEG 6000 or PLX-188) were dissolved in an appropriate volume of ethanol (100 mL) and distilled water (100 mL), respectively (Table 1). These solutions were magnetically stirred for 24 h at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) in the dark and were then mixed. These formulations at 1:1 ethanol/water ratio were magnetically stirred for more 24 h at the same conditions. The spray drying procedure was carried out using a Labmaq spray-dryer (MSD 0.5 model, Ribeirão Preto, Brazil) that was set at a inlet air temperature of $135 \pm 5^\circ\text{C}$,

outlet air temperature of $50 \pm 5^\circ\text{C}$, feed flow rate of 0.20 L.h^{-1} , drying air flow rate of 50 L.min^{-1} , and atomizing air pressure of 3 kgf.cm^{-2} using a nozzle of 0.82 mm . All dried powders were carefully recovered, yield determined then stored at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) in sealed containers in dark conditions in a vacuum desiccator. Yield values of spray-dried SDs were tested by one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test. The significance level was set at $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

In order to provide a comparative analysis, physical mixtures (PM) between carriers and FA were prepared. Each polymer and drug was weighted at 1:1 ratio, mixed and ground with mortar and pestle.

Table 1. Composition of spray-dried solid dispersions containing FA

Composition	Formulation		
	0%	10%	20%
Aqueous phase			
Carrier (g)	4.00	3.60	3.20
Purified water (mL)	100.0	100.0	100.0
Organic phase			
Ferulic acid (g)	—	0.40	0.80
Ethanol (mL)	10.0 mL	10.0 mL	10.0 mL

2.3 Residual Moisture

The water content of FA, PVP-K30, PEG 6000, PLX-188 and spray-dried SDs was performed using an infrared moisture analyzer (Shimadzu, MOC63u model, Kyoto, Japan). For each sample, an amount of 1.000 g was placed on an aluminum plate and dried at 105°C until constant weight. The percentage corresponding to mass loss was obtained as moisture content. This analysis was carried out in triplicate.

2.4 Solubility Studies

Saturation solubility studies were performed for pure FA and spray-dried SDs. A sample containing FA in amount that exceeded its solubility (15 mg of FA) was added to a volumetric flask containing purified water (25 mL) and kept under magnetic stirring at 150 rpm at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) for 48 h . The resulting

suspension was filtered through a membrane filter of polyvinylidene fluoride (Durapore[®] membrane, 0.22 μm pore size, Millipore, Bedford, MA, USA). The final concentration of FA was spectrophotometrically determined at 320 nm and the solubility of each sample was then calculated in triplicate. The relative solubility of FA from spray-dried SDs was reported in percentage compared to pure drug as mean and standard deviation.

2.5 Drug content

The amount of FA in SDs (mg.g^{-1}) was performed using an HPLC system (Varian Pro-star SYS-LC-240-E HPLC System, Walnut Creek, CA, USA). In brief, an exact mass of solid dispersions was weighed, equivalent to 20 mg of FA. This material was dispersed in 7 mL of methanol and kept for 12 h with magnetic stirring at $1000 \text{ rev.min}^{-1}$. The volume was then adjusted to 10 mL with a volumetric flask and filtered through a membrane filter of polyvinylidene fluoride (Durapore[®] membrane, 0.22 μm pore size). After suitable dilution in methanol, the concentration of FA was determined by HPLC using a Varian C₁₈ analytical column (Walnut Creek, CA, USA) (250 x 4.6 mm, 5 μm) using UV detection at 320 nm, in triplicate. The mobile phase consisted of methanol and water adjusted to pH 3.0 with 0.1 N *orthophosphoric acid* (48:52 v/v) at an isocratic flow rate of 1.0 mL.mL^{-1} . The validation of this HPLC method was previously performed through the following parameters: linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, robustness, precision and specificity.²² The concentration range varied from 10.0 to 70.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Linearity was 0.9998 and the detection limit was $0.334 \mu\text{g.mL}^{-1}$.²³ The drug content in spray-dried SDs was expressed as relative values compared to the theoretical mass used to obtain these formulations.

2.6 Solid-state characterization of SDs

2.6.1 Scanning electron microscopy (SEM)

The samples were mounted on aluminum stubs, sputtered with gold (IC-50 Ion Coater, Shimadzu, Kyoto, Japan) and analyzed using a scanning electron microscope (SSX-550 Superscan, Shimadzu, Kyoto, Japan) at an accelerating voltage of 10 or 15 kV with different magnifications.

2.6.2 X-ray powder diffraction

Wide-angle X-ray powder diffraction (XRPD) was performed with a Shimadzu X-ray diffractometer (Shimadzu XRD-6000, Kyoto, Japan). The 2θ value was increased from 5° to 80° at a scan rate of $2^\circ.\text{min}^{-1}$ using a Cu-K α source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA.

2.6.3 Fourier-transformed infrared spectroscopy

The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra of raw materials, solid dispersions and physical mixtures were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} on a Shimadzu IR Prestige-21 spectrophotometer (Kyoto, Japan) using KBr pellets with 32 scans and resolution of 4 cm^{-1} .

2.6.4 Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermogravimetric curves were obtained in a thermobalance (TGA-50, Shimadzu, Kyoto, Japan) in the temperature range of 25 – 900°C using platinum crucibles with $5.0 \pm 0.1 \text{ mg}$ of sample under dynamic N_2 atmosphere, flow rate of $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ and heat flow of $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$. Each onset temperature of thermal decomposition was then obtained by the 1st derivative curve (derivative thermogravimetric analysis). The equipment was previously calibrated with copper sulphate pentahydrate.

2.7 *In vitro* drug release

In vitro release experiments were carried out for the pure drug and spray-dried SDs as tablets. An exact amount of SDs (equivalent to 15 mg of FA) was compressed using a laboratory hydraulic press (Perkin Elmer, 15011 model, Norwalk, CT, USA) equipped with a 13 mm flat faced punch. The direct compression was performed at $3 \text{ t}.\text{cm}^{-2}$ for 2 min . The compressed tablets ($n = 6$) contained no other pharmaceutical excipients. Dissolution assays were performed in a Nova Ética dissolution tester (299/6, Vargem Grande Paulista, Brazil) equipped with paddle (apparatus II) in 900 mL of degassed phosphate buffer solution $\text{pH} = 7.0$ (50 mM) for 150 min in triplicate.^{19,6}

The system was kept at a thermostatically controlled temperature of $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and stirred at 50 rev.min^{-1} . All experiments were performed under dark conditions. At predetermined time intervals, samples were collected (10 mL), filtered (0.45 μm pore size) and spectrophotometrically determined (Genesys 10S spectrophotometer, Thermo Scientific, Madison, WI, USA) at 320 nm according to a previously determined calibration curve (ranging from 2 to 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $y = 0.077x + 0.0027$, $r = 0.999$).

Dissolution values were obtained from the amount of drug released at each time interval. A correction factor was applied to the cumulative dilution caused by replacement of sample with an equal volume of fresh medium.

2.7.1 Analysis of release behavior

Dissolution profiles of FA and solid dispersions were compared by model-independent and model-dependent methods. As model-independent analysis, dissolution efficiency, the area under a dissolution curve between defined time points²⁴, was used. One-way ANOVA (single factor: formulation) with Tukey's *post hoc* test was also used to compare dissolution profiles of pure drug and spray-dried SDs²⁵ by Microsoft Excel 2007 software (Salt Lake City, UT, USA). A p value of ≤ 0.05 was used to indicate statistically significant differences. *In vitro* profiles were also investigated by model-dependent approaches using the MicroMath Scientist™ 2.01 software (Salt Lake City, UT, USA). Data were tested to fit first-order, biexponential, zero-order and Weibull equations.²⁶ The selection of model-dependent method was based on the best correlation coefficient (r), the best model selection criteria (MSC), and the best graphic adjustment.

2.8 *In vitro* antioxidant potential

In order to compare the antioxidant capacity of pure FA and spray-dried SDs, free radical-scavenging potential was evaluated by 2,2-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation decolorization assay. Aqueous solutions of pure drug and spray-dried SD (PEG 6000 10%) at the same concentrations from 25 to 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ were prepared 30 min before the start of the experiment and kept under dark conditions.

In brief, aqueous solutions of 7 mmol.L^{-1} ABTS and 2.45 mmol.L^{-1} potassium persulfate were mixed in a volume ratio of 1:1 and incubated in the dark at room

temperature for 12 h to obtain ABTS^{•+}.²⁷ ABTS^{•+} solution was diluted to an absorbance value of ± 0.7 at 734 nm in 50 mmol.L⁻¹ sodium phosphate buffer solution (pH = 7.4). The reduction between ABTS^{•+} and pure drug or SD (PEG 6000 10%) was measured by decreasing in absorbance at 734 nm after 0, 30 and 60 min in a microplate reader (SpectraMax 190 spectrophotometer, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). All measurements were performed in triplicate and formulation PEG 6000 0% were used as negative control. The antioxidant activity was calculated as percentage of ABTS^{•+} inhibition according to the Equation 1.

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{(Ab - Aa)}{Ab} \right] \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

Where *Ab* is the absorbance of the control and *Aa* is the absorbance of the sample.

2.9 *In vivo* anti-platelet assay

2.9.1 Animals

The anti-platelet activity experiments were performed using male Wistar rats of about 200 g from Central Animal Facility of State University of Ponta Grossa. The animals were kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and *ad libitum* access to food and water in controlled conditions of light (light-dark cycle of 12/12 h).

2.9.2 Experimental protocol

Thirty two rats were randomly divided into four groups of eight animals. Group 1 received PEG 6000 0% formulation (equivalent mass amount to group 3, orally), group 2 received pure FA (30 mg.kg⁻¹, orally), group 3 received PEG 6000 10% SD (amount equivalent to 30 mg of FA.kg⁻¹, orally) and group 4 received aspirin as standard anti-platelet agent (30 mg.kg⁻¹, orally). These treatments were carried out during 10 consecutive days by a gastric gavage once-a-day. One hour from last dose administered, rats were anesthetized with ketamine and xylazine (55 and 8 mg.kg⁻¹, respectively) and their right carotid artery was cannulated for blood sampling. Finally, rats were slaughtered using an anesthetic overdose.

2.9.3 Preparation of platelet rich plasma (PRP) and platelet poor plasma (PPP)

The blood (6 mL) was collected in tubes containing 4% trisodium citrate solution. Samples were centrifuged at room temperature for 15 min at 100 X g to obtain PRP. The plasma was carefully removed and centrifuged at 900 X g for 10 minutes to obtain a platelet pellet which was resuspended in fresh autologous plasma. The supernatant from the final centrifugation was the platelet poor plasma (PPP).

2.9.4 Platelet aggregation test

The platelet aggregation assay was performed in a 96 well plate and the absorbance was obtained on a Bio-Tek Synergy H1 multi-mode reader at 650 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). The agonist (collagen type I, 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was added into each well. Then, plasma containing platelets at a concentration of 200×10^6 platelets per well was added for a final volume of 150 μL . Readings were taken at time zero and after 15 min to induce platelet aggregation. The plate shaking time was 10 seconds before the start of the test with amplitude of 2 mm (174 rpm) and 3 seconds before each reading with amplitude of 1 mm (114 rpm) at 37°C.

2.9.5 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of mean. Comparisons among groups were tested by one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc* test. The significance level was set at $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 5.00, San Diego, CA, USA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Solid dispersions containing FA were obtained by spray-drying from PVP-K30, PEG 6000 and PLX-188. After drying, PVP-K30 and PEG 6000 formulations showed typical powder characteristics. However, PLX-188 formulations resulted in a viscous and sticky liquid character in the collection flask with changed to a solid aspect after cooling. This result can be related to the low theoretical T_g value of the mixture²⁸ which underwent a solid transition process even working at the lowest outlet air temperature during spray-drying procedure ($50 \pm 5^\circ\text{C}$). All spray-dried SDs had a pale yellow color similar to pure FA.

The yields of spray-dried SDs are summarized in Table 2 as mean and standard deviation. Mean values lower than 50% were achieved for all formulations which are usual findings in literature²⁸ due to a loss on the dryer chamber wall during drying, leading to low product yield.²⁹ In particular, formulation PEG 6000 10% presented a statistically higher yield than PVP-K30 20%, PLX-188 10% and PLX-188 20% formulations ($p < 0.05$).

Table 2. Yield, water content and drug content for spray-dried solid dispersions containing ferulic acid

Formulation	Yield (%)	Water content (%)	Drug content (%)
PVP-K30 10%	36.0 ± 1.4	17.76 ± 0.08	101.96 ± 0.79
PVP-K30 20%	32.9 ± 3.4	15.73 ± 0.12	100.28 ± 1.15
PEG 6000 10%	46.1 ± 4.9	2.03 ± 0.24	98.82 ± 1.54
PEG 6000 20%	39.2 ± 4.4	2.87 ± 0.19	101.23 ± 1.41
PLX-188 10%	27.9 ± 5.5	2.72 ± 0.07	86.86 ± 8.53
PLX-188 20%	27.2 ± 3.5	2.22 ± 0.09	73.44 ± 9.25

Results are represented as mean ($n = 3$) ± standard deviation

3.1 Residual Moisture

Water content has been shown to be a critical parameter for dissolution performance and stability of solid dispersion system.^{30,31} Product with lower moisture content is preferred over that with higher moisture content. This parameter may determine physical stability and overall performances of the solid dispersion as it will affect the crystallization tendency of amorphous solid dispersion. Hence it is critical to characterize the water content of solid dispersion.²⁸ Table 2 lists the water content of spray-dried formulations. Raw materials showed water content of 1.47% (pure FA), 18.23% (PVP-K30), 1.46% (PEG 6000) and 1.48% (PLX-188). Therefore, spray-dried SDs possessed water content similar to those obtained for corresponding carriers. Low moisture contents were obtained for PEG 6000 and PLX-188 formulations which

demonstrates that drying conditions were properly chosen. Due to their lower water content, these spray-dried SDs would be more stable than that prepared using PVP-K30. The presence of a high water content in PVP-K30 10% and PVP-K30 20% shows that these products were not completely dried after spray drying. This may be attributed to high hygroscopicity of PVP polymers.³²

3.2 Solubility Studies

Pure FA showed a water solubility of $6.47 \pm 0.08 \text{ mg.dL}^{-1}$ at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ similar to that reported in literature.³³ Considering that this solubility value was set as 100%, all spray-dried SDs improved relative solubility of FA compared to pure drug. Increases of $171.66 \pm 3.17\%$, $96.12 \pm 2.49\%$, $203.21 \pm 4.05\%$, $152.11 \pm 2.42\%$, $214.73 \pm 3.42\%$ and $163.06 \pm 2.98\%$ were observed for PVP-K30 10%, PVP-K30 20%, PEG 6000 10%, PEG 6000 20%, PLX-188 10% and PLX-188 20%, respectively. These data indicate that FA solubility in these formulations was initially dependent on type and concentration of carrier used. The best result was obtained for formulation PLX-188 10% in which PLX-188:FA ratio was 9:1.

PVP-K30 and PEG 6000 are polymeric carriers widely used to prepare second generation SDs. These solubilizing enhancers are able to create amorphous solid dispersions.³⁴ These systems can reduce the drug particle size to nearly molecular level, solubilize or co-dissolve the drug, provide better wettability and dispersibility of the drug in the carrier material,³⁵⁻³⁷ which together lead to improved relative drug solubility. PLX-188 is a highly water soluble, polymeric surfactant used to obtain third generation SDs. Arrangement of the ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) blocks in PLX-188 results in an amphiphilic structure, which has the properties to self-assemble into micelles in aqueous solution;³⁸ the hydrophobic core (PO block) can act as reservoir for the drug, while the hydrophilic portion (EO) acts as interface between aqueous medium and drug. At higher concentration, these monomolecular micelles associate to form aggregates of varying size, which have the ability to solubilize drugs and to increase the stability of solubilized agents.³⁹ Solubilization is likely to occur through the following mechanism. In the dry state, drug particles were in close contact or adhered to the polymer particles as a result of mixing. When the mixture came in contact with water, the polymer particles might have hydrated rapidly into polymer solution solubilizing the adjacent drug particles and subsequently releasing the drug into the medium.⁴⁰ In that sense, the combined action of surface

activity, solubilization and wetting properties can possibly explain the higher relative solubility of FA using PLX-188 than those observed using PVP-K30 and PEG 6000. In addition, the best results were observed for formulations containing higher carrier concentration (PLX-188 10%, PEG 6000 10% and PVP-K30 10%) in which an enhanced drug solubilization effect was found.

3.3 Drug content

Drug content for the spray-dried SDs are summarized in Table 2. Percentage values close to 100% were obtained for the drug content for formulations prepared using PVP-K30 and PEG 6000. In addition, spray-dried SDs prepared using PVP-K30 and PEG 6000 showed low values of standard deviation for drug content that indicate uniform drug distribution in these formulations. Therefore, the drying conditions appeared to be reproducible for the preparation of these SDs.⁴¹ However, PLX-188 formulations showed lower drug content with high standard deviation that suggest an inappropriate drug distribution in carrier. This finding can be related to spray-drying conditions performed. Even operating at the lowest outlet air temperature, the spray-dried products containing PLX-188 resulted in a viscous and sticky liquid that became solid after cooling. Processes of drug recrystallization and phase separation may have occurred during cooling that led to heterogeneous final formulations as previously reported.²¹ Therefore, this heterogeneous distribution of the drug in PLX-188 may justify the lower drug content values obtained for these spray-dried SDs.

3.4. Solid-state characterization of spray-dried SDs

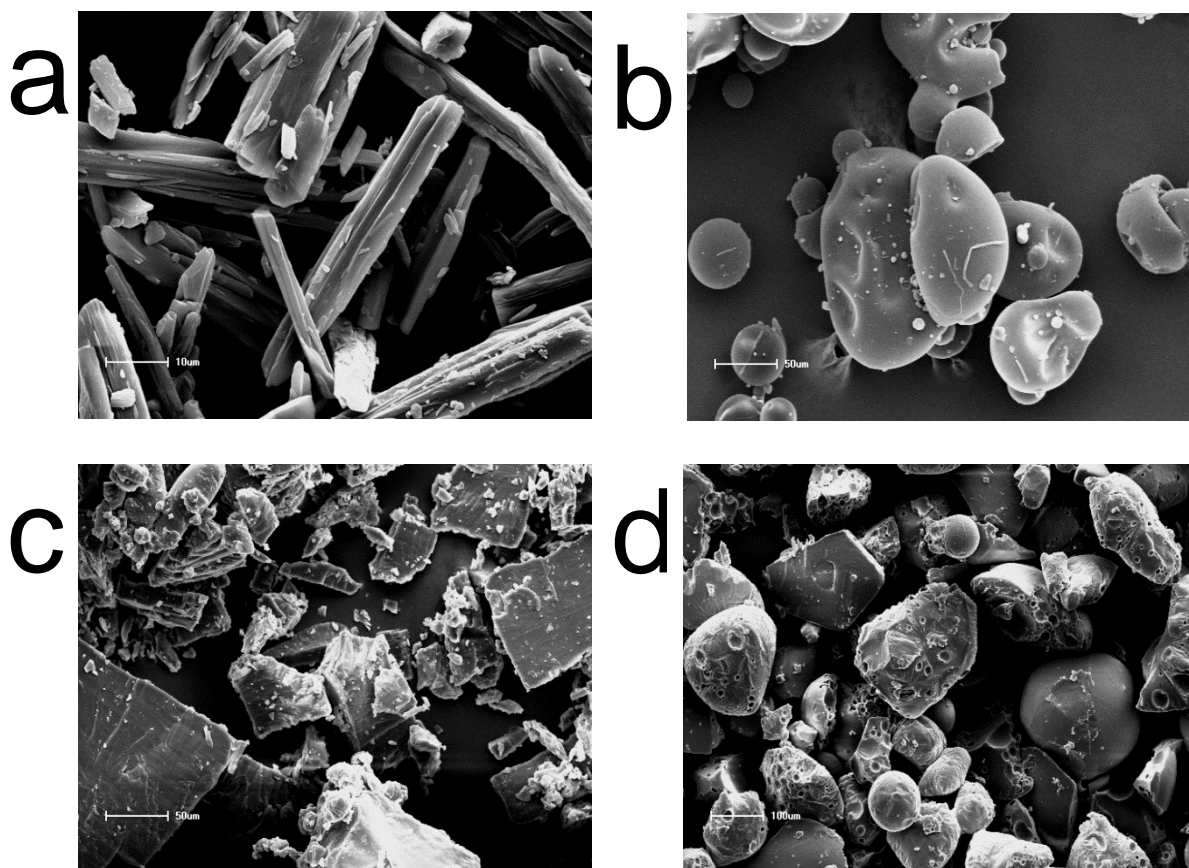
3.4.1 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy has been widely used in the characterization of amorphous solid dispersions. SEM analysis of amorphous solid dispersions can be used to probe particle morphology and to examine the surface and near-surface areas after dispersion formation by techniques such as spray-drying, electrospinning, or milling of hot melt extrusion fragments.⁴²

The scanning electron micrographs of pure FA and carriers are shown in Figure 1. It was observed that FA (Figure 1a) had a crystalline morphology. PVP-K30 (Figure 1b) was composed by spherical particles with some depressions on its surface and amorphous characteristics. PEG 6000 (Figure 1c) was made up of large

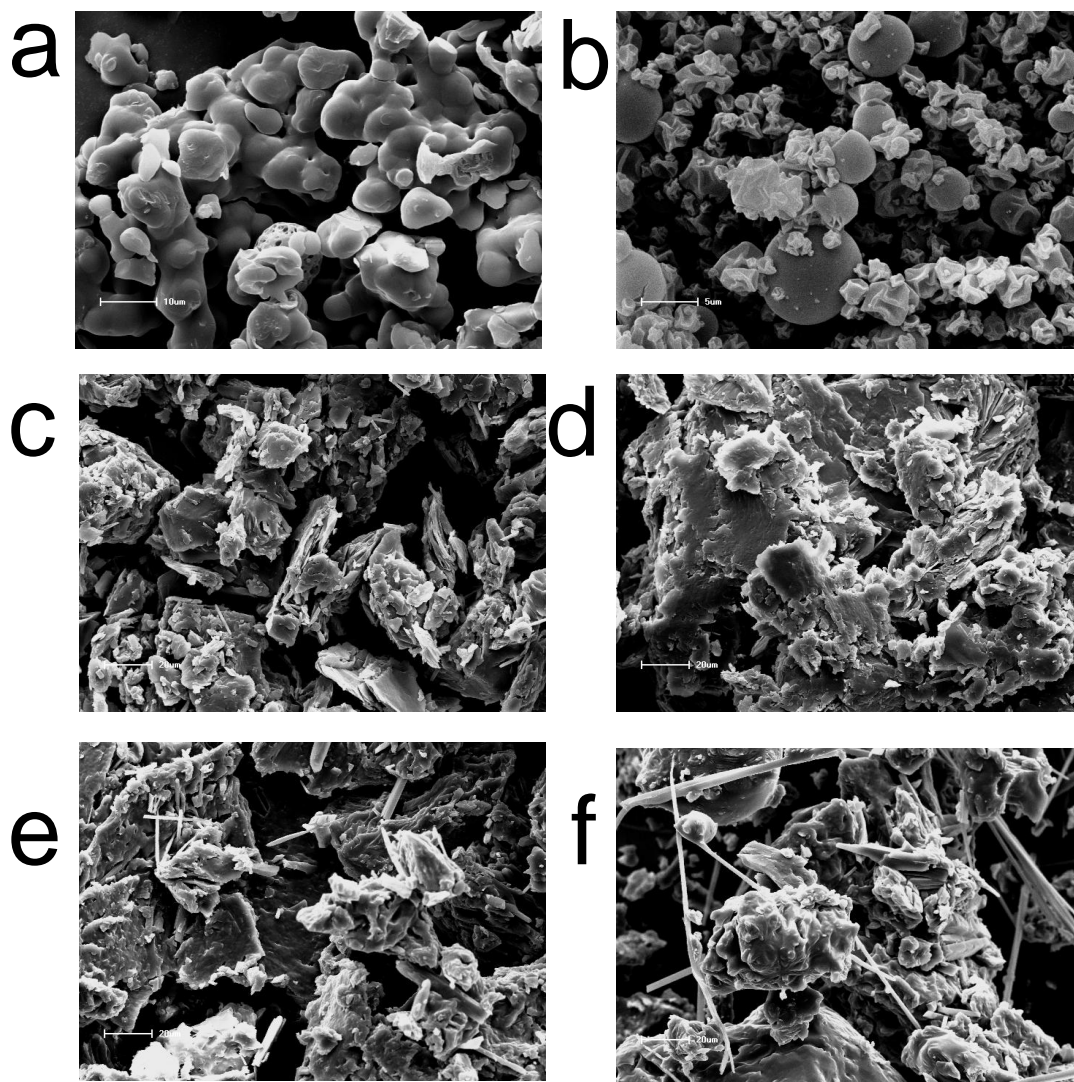
crystalline particles of irregular size. PLX-188 (Figure 1d) showed spherical and almost-spherical particles with some depressions on its surface.

Figure 1. Scanning electron micrographs: FA (a), PVP-K30 (b), PEG 6000 (c) and PLX-188 (d). Magnification of 240x.



The scanning electron micrographs of spray-dried SDs are represented in Figure 2. New morphologies of different aspects were observed depending on the carrier used. PVP-K30 SDs showed spherical and shriveled aggregates of irregular shape (Figure 2a,b). PEG 6000 formulations resulted in rough aggregates of irregular size (Figure 2c,d). No FA crystals were observed on the surface of PVP-K30 and PEG 6000 formulations. Spray-dried SDs prepared with PLX-188 appeared as irregular aggregates containing drug crystals on surface (Figure 2e,f).

Figure 2. Scanning electron micrographs of solid dispersions: PVP-K30 10% (a), PVP-K30 20% (b), PEG 6000 10% (c), PEG 6000 20% (d), PLX-188 10% (e) and PLX-188 20% (f). Magnification of 500 X.



For spray-dried SDs obtained from PVP-K30 and PEG 6000, the original crystalline morphology of FA disappeared, and it was not possible to differentiate the morphology of either of these hydrophilic polymers.⁴³ Considering these results for PVP-K30 and PEG 6000, it is possible to determine the presence of FA as a solid solution in carrier as previously reported for SDs prepared using fenofibrate.⁴⁴ PLX-188 products exhibited needle crystal structures on surface of aggregates which implied that solid suspensions were obtained. However, further XRPD experiments

are required in order to investigate crystallinity of these formulations and to discuss the possible structure of these drug-carrier SDs.⁵

In addition, the presence of crystals in PLX-188 SDs can be related to the spray-drying procedure in which these formulations showed firstly a viscous and sticky liquid aspect that changed to a solid after cooling. SDs should form a thermodynamically stable system. However, since SD formation occurred only after cooling, it may have caused the nucleation process and drug precipitation.⁵

3.4.2 XRPD

X-ray powder diffraction is one of the most common techniques for verifying different solid forms of a material. It can differentiate amorphous SD from crystalline materials and in most cases readily exhibits differences between diverse crystalline forms based on the peak positions and intensities observed in the powder patterns.⁴⁵ In addition, amorphicity of SDs has been previously reported as crucial in ensuring a suitable final performance to these systems.²⁸

In order to examine cristallinity of spray-dried SDs compared to the physical mixtures and the pure drug, XRPD experiments were performed and results are shown in Figure 3. Diffractogram of pure FA presented main sharp peaks at 2θ values of 9.02, 12.86, 15.62 and 26.46°. These X-ray diffraction peaks were also assigned in physical mixtures which indicate the presence of crystalline FA in those samples. PVP-K30 showed fully amorphous while PEG 6000 revealed two peaks at 19.32 and 23.34° and PLX-188 presented also two peaks at 19.27 and 23.34°.

The diffractograms of spray-dried formulations prepared using PVP-K30 demonstrated non-crystalline/amorphous halos. Similarly, spray-dried SDs of PEG 6000 and PLX-188 presented a remarkable decrease of crystalline peaks of FA compared to the physical mixtures. These data demonstrated that spray-drying procedure led to drug amorphization in different intensities and demonstrate that each carrier has a particular ability in interrupting crystalline structure of FA.⁴³

Amorphous solid dispersions can be classified according to the molecular interaction of drug and carriers in solid solutions, solid suspensions or a mixture of both.⁴⁴ In amorphous solid solutions, drug and carrier are totally miscible and soluble, originating a homogeneous molecular interaction between them. In these systems, the drug and carrier interaction energy is extremely high, resulting in a really true

solution.³⁷ This type of amorphous solid dispersion is homogeneous on a molecular level. On the other hand, amorphous solid suspensions occur when the drug has limited carrier solubility or an extremely high melting point. Molecularly, the obtained dispersion does not have a homogeneous structure, but is composed by two phases.³⁴ Our XRPD patterns suggests that PVP-K30 led to obtain a solid solution system while PEG 6000 and PLX-188 can be resulted in a mixture of solid solution and solid suspension. For PLX-188 formulations, this result is reinforced by SEM micrographs in which FA crystals were observed.

The more amorphous systems can dissolve at a faster rate because of higher internal energy and greater molecular motion which enhance the thermodynamic properties relative to crystalline materials.⁴⁶ For this reason, *in vitro* dissolution experiments are required in order to evaluate the performance of SDs formulation for *in vivo* potential use.

3.4.3 FTIR spectroscopy

Drug-polymer interaction has been reported to be important for physical stability of a solid dispersion system.²⁸ For example, hydrogen bond formation between drug and polymer chains may make it more energetically favorable for the drug and polymer to interact with each other rather than with themselves, resulting in changes on dissolution performance.⁵ FTIR spectroscopy was used in the current study to investigate the FA interaction with three carriers system.

Figure 4 displays the FTIR spectra of pure FA, PVP-K30, PEG 6000 and PLX-188, corresponding physical mixtures and spray-dried SDs. FTIR spectrum of pure FA consisted of absorption bands of OH group stretching vibration (3442 cm^{-1}), aromatic and alkene C–H stretching vibrations (3018 cm^{-1}), alkane C–H stretching vibration (2972 cm^{-1}), aromatic conjugated C=O stretching vibration (1691 cm^{-1}), C=C aromatic stretching vibration ($1618, 1595, 1518, 1432\text{ cm}^{-1}$), C–O–C asymmetric stretching vibration (1277 cm^{-1}), and C–OH stretching vibration (1204 cm^{-1}). FTIR spectrum of PVP-K30 presented a broadened band (3472 cm^{-1}) due to water molecules because PVP is a highly hydrophilic polymer.⁴⁷ In addition, bands of C–H stretching vibration ($2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) and C=O stretching vibration of tertiary amide (1670 cm^{-1}) were also assigned. FTIR spectra of PEG 6000 and PLX-188 showed two typical bands of C–H stretching vibration ($2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) and C–O stretching

vibration of aliphatic ether (1110 cm^{-1}). Band assignments of each physical mixture corresponded simply to the superposition of FTIR spectra of pure FA and carrier.

Figure 3. XRPD patterns of FA, PVP-K30 (a), PEG 6000 (b), PLX-188 (c), physical mixtures (PM) and spray-dried SDs

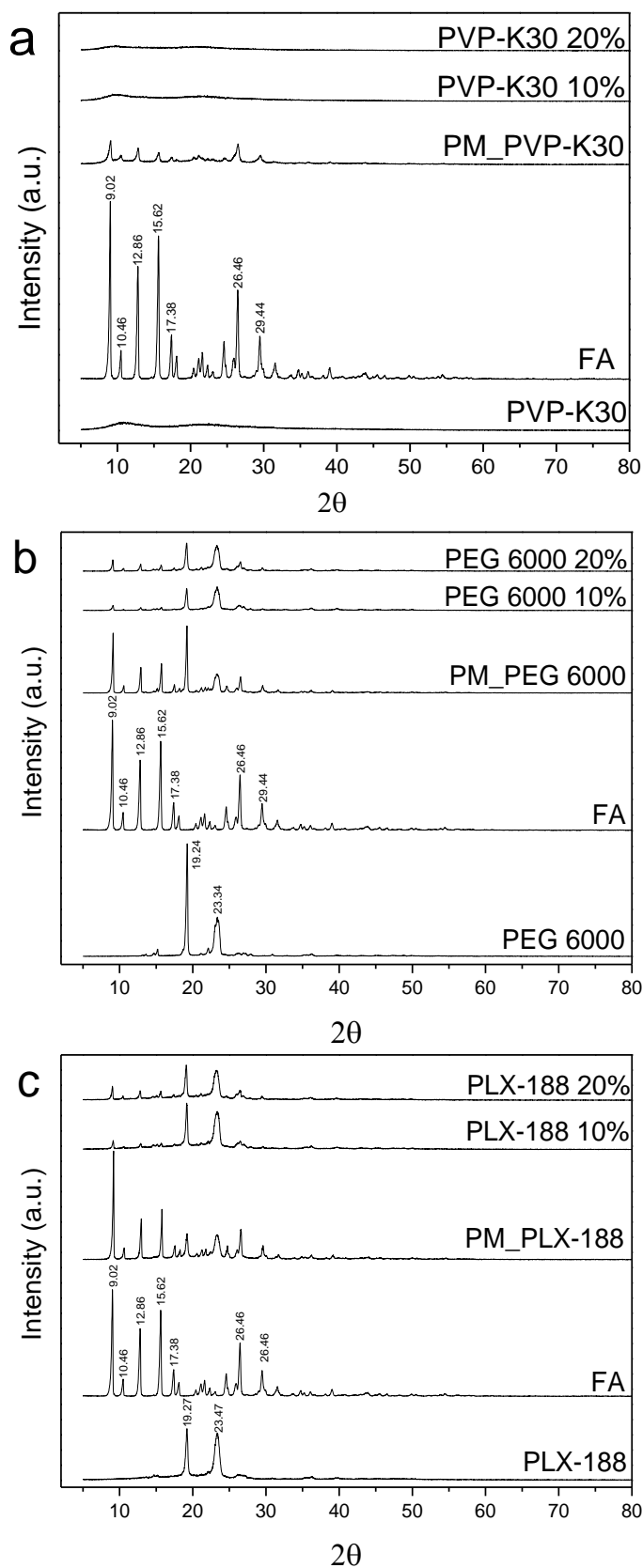
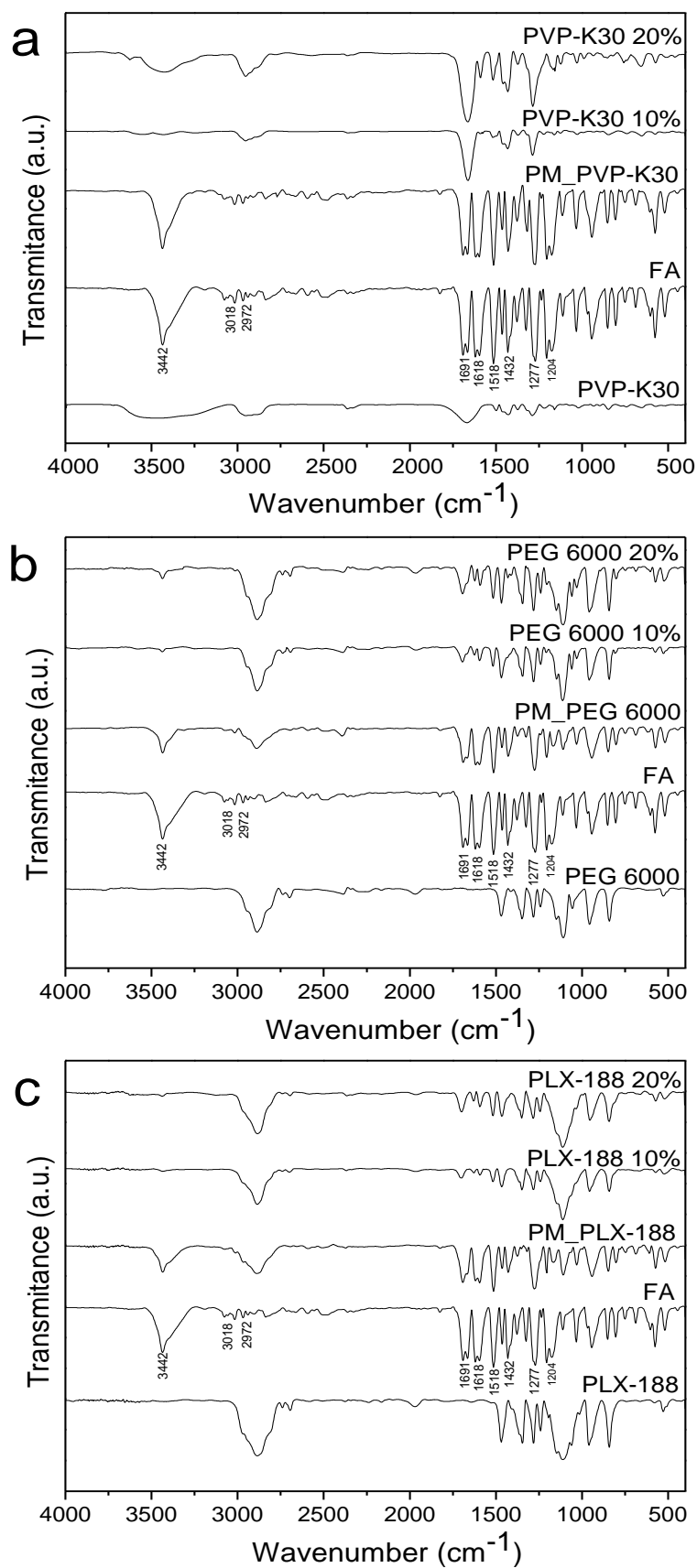


Figure 4. FTIR spectra of FA, PVP-K30, PEG 6000, PLX 188, physical mixtures (PM) and spray-dried SDs.



Formulations obtained using PVP-K30 demonstrated broadening and shifts involving OH and C=O bands. This result suggested that intermolecular O–H...O=C bonds were formed between FA and PVP-K30 after the spray-drying procedure. The chemical structure of PVP indicates that it can act as a proton acceptor due to carbonyl oxygen (this characteristic band was displayed at approximately 1670 cm^{-1}) or nitrogen in pyrrole ring. However, because of the steric hindrance effect, the nitrogen is impeded from participating in the intermolecular interactions; therefore the carbonyl group is more favorable for hydrogen bonding.⁴⁷

Spray-dried SDs produced by the use of PEG 6000 and PLX-188 were similar to the corresponding physical mixtures. These results indicated no remarkable interaction between carrier and drug. However, due to the low content of drug in SDs (10 and 20%, w/w), its detection would have been difficult using FTIR.⁴³

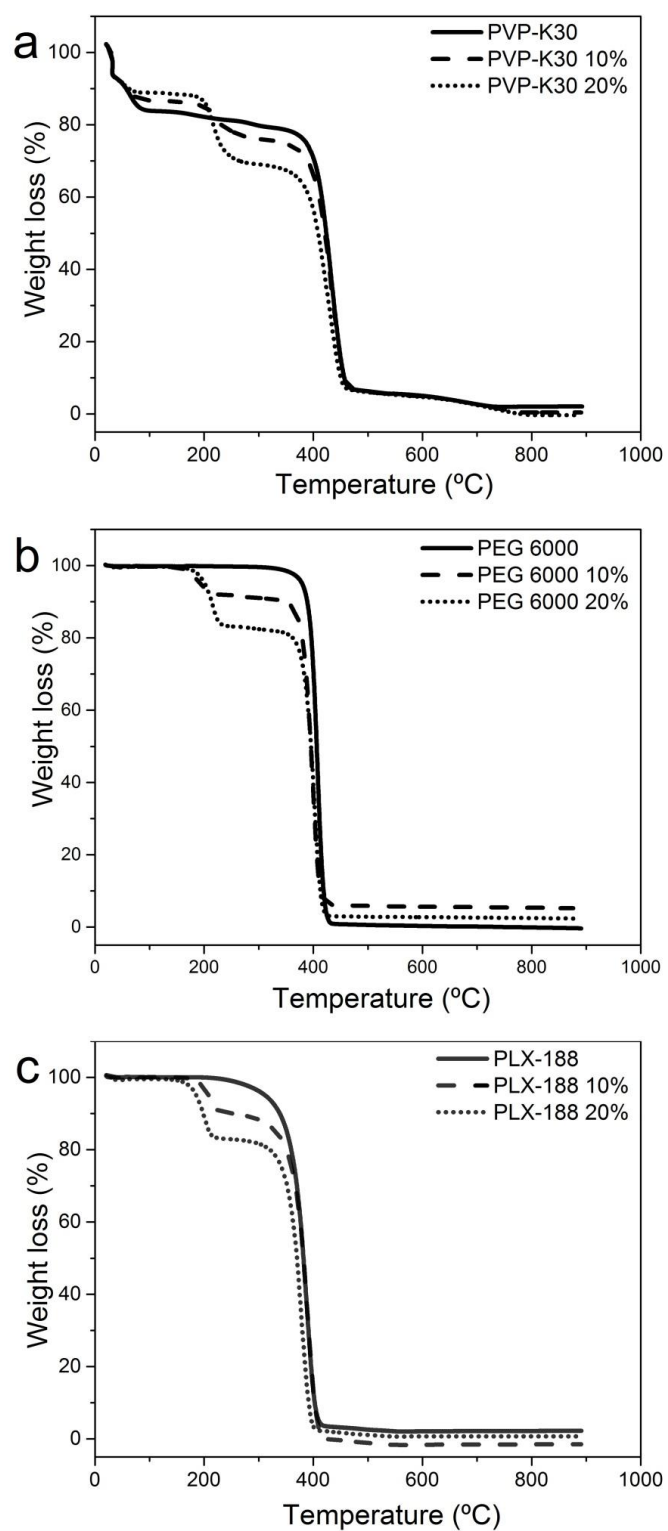
Overall, the intensity of drug-polymer interaction is higher for PVP-K30 and lower for PEG 6000 and PLX-188. This result is in accordance to the amorphization concluded from the XRPD of spray-dried SDs. PVP-K30 formulations revealed complete non-crystalline/amorphous while a partial crystalline behavior was recorded for PEG 6000 and PLX-188 formulations. Thus, it is hypothesized that the degree of drug-polymer interaction can interfere with the degree of amorphicity in solid dispersion during the manufacturing process as previously reported.²⁸

3.4.4 Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis is an experimental method whereby changes in mass are used to detect and measure the thermal degradation process that occurs upon heating a sample. Thermal degradation of SDs is an important issue from both the academic and the industrial viewpoints. Understanding the thermal degradation of these materials during the heating process is of paramount importance for developing a rational technology of polymer/surfactant processing and for predicting the effects of the drug on previously-known thermal stability of these chosen carriers.^{48,49}

Figure 5 depicts the steps of thermal degradation for carriers and spray-dried SDs. PVP-K30 displayed a two-stage thermal decomposition profile while PEG 6000 and PLX-188 presented only one-stage of thermal decomposition. PVP-K30 10% and PVP-K30 20% formulations showed three-stages of thermal decomposition.

Figure 5. TGA curves of spray-dried SDs.

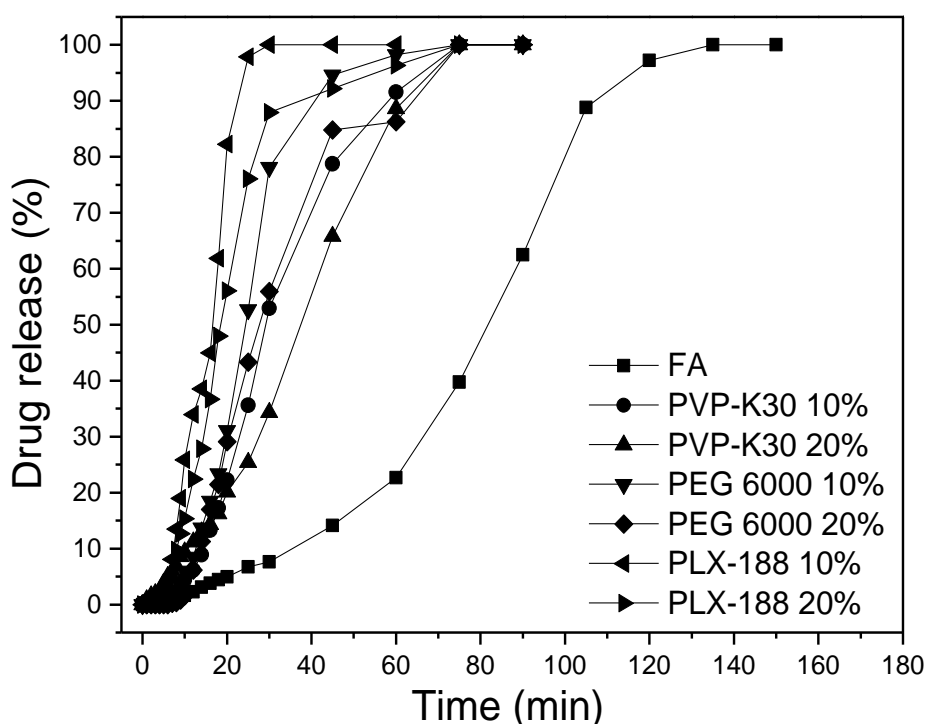


For these formulations, the first stage of weight loss was intense and associated with water loss. The second and third stages were attributed to a combination of polymer chain and drug degradation and volatilization of their decompositions products, respectively. PEG 6000 10%, PEG 6000 20%, PLX-188 10% and PLX-188 20% showed two-stage thermal decomposition profiles with similar thermal behavior observed for formulations containing PVP-K30, however no water loss was detected. Moreover, thermograms indicated that the onset decomposition temperature of all formulations were above 140 °C (PVP-K30 10% = 153.8 °C; PVP-K30 20% = 144.6 °C; PEG 6000 10% = 172.4 °C; PEG 6000 20% = 153.7 °C; PLX-188 10% = 174.2 °C; PLX-188 20% = 152.1 °C) under N₂ flux, which denote that spray-dried SDs possessed a suitable thermal stability.

3.4 *In vitro* dissolution studies

The *in vitro* dissolution behavior of SDs remains elusive and highly individualized, yet rational design of SDs with optimal performance and prediction of their *in vitro/in vivo* performance are very much desired in pharmaceutical industry.⁵⁰ In general, SDs represents a useful pharmaceutical technique for increasing dissolution of drugs in dosage forms. Several mechanisms have been proposed to account for the increase in dissolution kinetics of drugs from SDs.⁵¹ In brief, three scenarios are possible for drug dissolution from SDs. (A) Particles dissolve rapidly and release the drug into a highly supersaturated solution; subsequently, the drug precipitates as amorphous and/or crystalline particles onto which the polymer adsorbs as a stabilizer; (B) drug and polymer are gradually released while drug remains amorphous in the undissolved particles; and (C) drug and polymer are gradually released but drug is present as crystals in the undissolved particles especially near their surfaces. The free drug concentration is dependent on the solubility of either amorphous or crystalline drug which in turn depends on the drug/polymer ratio, polymer dissolution rate and drug crystallization rate.⁵ Taking into account all the above, *in vitro* dissolution experiments are crucial to indicate the more suitable formulation for further *in vivo* analysis.

The dissolution profiles of pure drug and spray-dried SDs obtained from PVP-K30, PEG 6000 and PLX-188 in phosphate buffer solution pH = 7.0 (50 mM) are compared in Figure 6. An 80% release of pure FA was obtained in 98.0 minutes.



In order to compare the percentage dissolved between formulations at each time point, Tukey's *post hoc* test was performed on one-way ANOVA results.⁵⁴ This analysis indicated a statistically significant difference between pure drug and all spray-dried formulations: PVP-K30 10% ($p = 0.0389$), PVP-K30 20% ($p = 0.0396$), PEG 6000 10% ($p = 0.0223$), PEG 6000 20% ($p = 0.0434$), PLX-188 10% ($p = 0.0006$) and PLX-188 20% ($p = 0.0028$). However, no statistical difference was observed when spray-dried SDs were compared in pairs. Thus, the nature of the carrier (PVP-K30, PEG 6000 and PLX-188) and drug loading (10 and 20%, w/w) were the critical or determining factors to improve dissolution rate of FA, however no significant effect was recorded when they were changed in prepared formulations. These *in vitro* dissolution data are strongly influenced by several parameters related to raw materials and spray-dried SDs which together resulted in enhanced dissolution for these formulations as particle size, surface area, surface tension, drug dissolution rate, final drug crystallinity, drug crystallization rate, drug supersaturation in presence of polymer, drug-polymer interaction, drug-polymer-water interaction, polymer solubility, polymer dissolution kinetics, and so forth.^{47,5,50}

The release profiles were adjusted to mathematical models and the selection of the best model was made by considering the factors of r , MSC and graphic adjustment and main results are shown in Table 3. Pure FA was better fitted to the biexponential equation while spray-dried SDs was better adjusted to the Weibull equation than other models. These results demonstrated that spray-dried SDs changed the dissolution profile of FA. While the pure drug showed a biexponential release behavior composed of two stages, when the first stage of release is rapid and the second stage of release is slow,⁵⁵ spray-dried formulations presented suitable fitting to Weibull model. Weibull distribution is widely used to adjust dissolution profiles from tablets and it can describe the dissolution curve in terms of applicable parameters. The shape parameter (b) characterizes the curve as either exponential ($b = 1$), S-shaped with upward curvature followed by a turning point ($b > 1$), or as one with a steeper initial slope than is consistent with the exponential ($b < 1$).⁵⁶ The calculated Weibull b parameter was >1 for all spray-dried SDs (Table 3), which indicates a complex release mechanism with an S-shaped curve with upward curvature followed by a turning point. Taken together, the analysis performed by *in vitro* dissolution experiments and model-dependent methods suggests that FA

release from spray-dried formulations is faster and based on a different mechanism than the pure drug.

In order to investigate the *in vitro* antioxidant potential and *in vivo* anti-platelet effect of spray-dried SDs containing FA, the PEG 6000 10% formulation was chosen for further assays due to its suitable powder aspect, the highest yield, lowest water content, high drug loading, lowest drug crystallinity, reduced drug-polymer interaction, and an immediate release pattern. PVP K-30 formulations presented high water content whereas PLX-188 SDs showed several disadvantages such as low drug content and crystals of FA.

Table 3. Release data obtained by fitting the dissolution profiles of pure FA and spray-dried SDs to the mathematical models

Release parameters and kinetic constants					
Materials	MSC	<i>R</i>	α (min ⁻¹)	β (min ⁻¹)	<i>b</i>
Pure FA	2.57	0.9747	0.0279	0.0281	—
PVP-K30 10%	6.48	0.9995	—	—	5.0731
PVP-K30 20%	3.56	0.9913	—	—	3.1441
PEG 6000 10%	5.18	0.9981	—	—	9.3931
PEG 6000 20%	5.40	0.9983	—	—	3.1204
PLX-188 10%	3.45	0.9894	—	—	6.8474
PLX-188 20%	5.37	0.9983	—	—	5.0610

3.5 Antioxidant potential

In order to explore if the spray-drying procedure influenced the antioxidant effect of obtained SDs, the free radical-scavenging capacity of pure FA and PEG 6000 10% formulation at the same drug concentrations and time intervals were compared. This assay is widely used for screening the antioxidant properties of different compounds and reflects their capacity to donate electrons or hydrogen for inactivating this organic radical.⁵³

The results for the ABTS radical cation discoloration test are shown in Figure 7. Considering ABTS^{•+}-scavenging potential, PEG 6000 10% formulation demonstrated an increased percentage of ABTS^{•+} inhibition at higher concentrations for all investigated time intervals (0, 30 and 60 min). This behavior was quite similar to the observed for pure FA which indicated that the antioxidant potential was maintained even after spray-drying procedure for preparation of SDs.

Spray-drying maximizes heat transfer and can be used for any product with a liquid-like behavior. This procedure provides a fast water removal and it is widely known for ensuring stability of heat-sensitive products such as antioxidants.⁵⁷ Thus, it can be suggested that spray-dried SDs are low cost, scaled-up formulations that demonstrate an appropriate antioxidant effect for FA.

3.6 *In vivo* assay

Anti-platelet aggregation drugs are used as mainstream first-line drugs for prevention and cure of arterial thrombus diseases.⁵⁸ FA and its derivatives are well-known as anti-platelet agents because they can activate blood circulation to dissipate blood stasis.⁵⁹ In this paper, the *in vivo* effect of PEG 6000 10% formulation on inhibition of a collagen-stimulated platelet aggregation was performed after 1 h from last dose administration in order to investigate whether this spray-dried SD was able to hasten the anti-platelet effect of FA.

The results are represented in Figure 8. A spray-dried SD containing no drug was used as the control and provided no inhibition of platelet aggregation. PEG 6000 10% formulation and aspirin presented a statistically significant anti-platelet effect compared to the control and pure FA. However, pure FA had no significant effect on inhibition of platelet aggregation compared to control. These data confirm that spray-dried SD properly improved the therapeutic effect of FA on inhibiting platelet aggregation. In addition, PEG 6000 10% formulation led to a similar result compared to aspirin, a gold standard anti-platelet drug.⁶⁰ Moreover, this performance was not achieved by pure FA at the same time interval. In summary, these findings demonstrate that spray-dried SDs containing FA can provide an *in vivo* immediate anti-platelet effect for FA and should be studied further as a new polymeric carrier to treat arterial thrombotic events.

Figure 7. Antioxidant effect of pure FA and PEG 6000 10% solid dispersion by ABTS^{•+}-scavenging assay: a) t = 0 min, b) t = 30 min and c) t = 60 min.

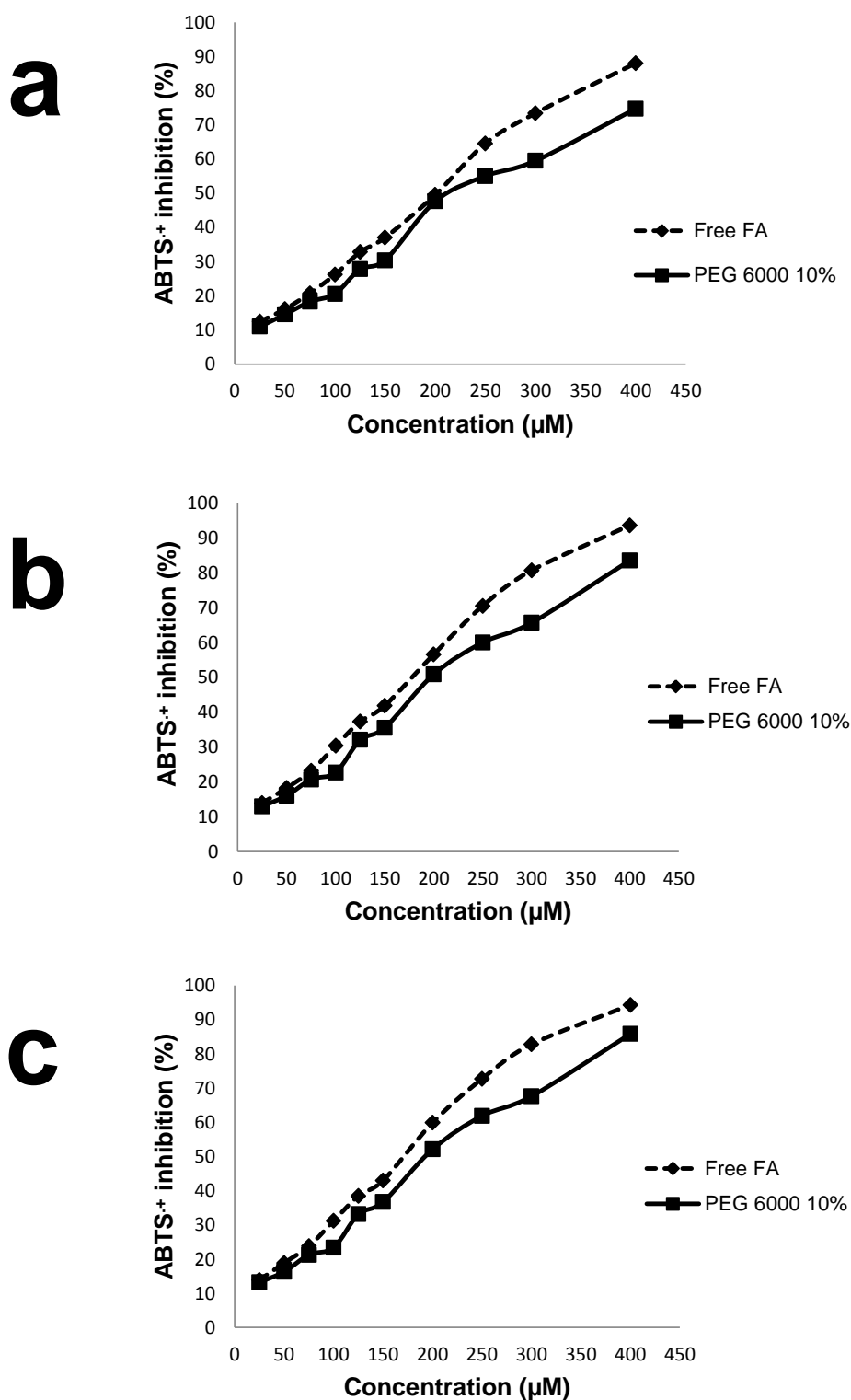
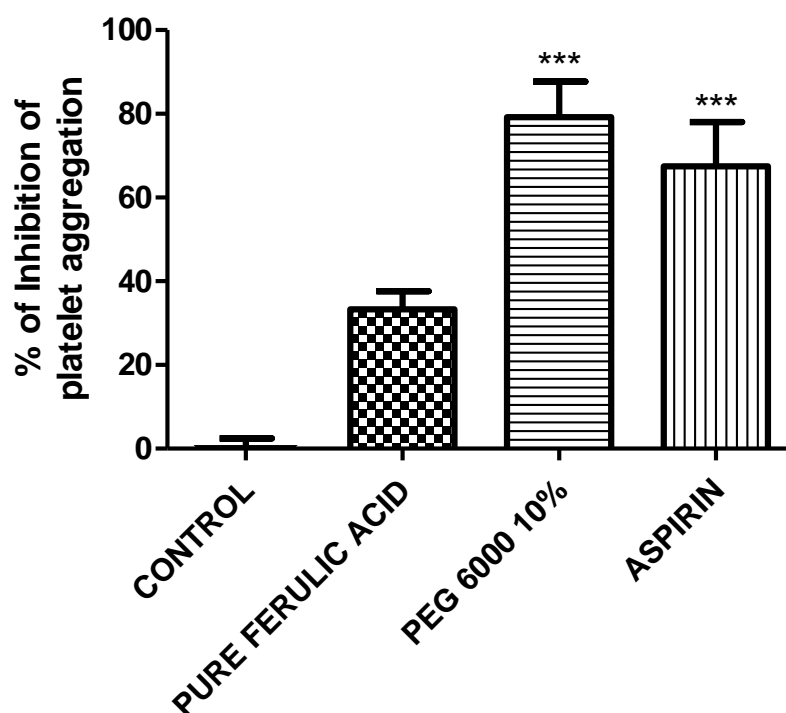


Figure 8. Percentage of inhibition of platelet aggregation of PEG 6000 0% (control), pure FA, PEG 6000 10% formulation and aspirin. Each bar represents mean \pm standard error of mean from 8 independent experiments. Asterisks denote significance levels compared to control: significantly different, *** $p < 0.001$, Bonferroni's test



CONCLUSION

Solid dispersions containing FA were successfully prepared by spray-drying using PVP K-30, PEG 6000 and PLX-188 as carrier. PEG 6000 formulations presented suitable yield, low water content, high drug loading, low drug crystallinity and reduced drug-polymer interaction. PVP K-30 formulations showed high water content whereas PLX-188 SDs had several disadvantages as low drug content and crystals of FA. All formulations enhanced relative solubility and dissolution rate of FA. The chosen spray-dried SD (PEG 6000 10%) demonstrated suitable *in vitro* antioxidant activity and a statistically significant *in vivo* anti-platelet effect compared to control and pure FA. These results support an experimental basis for the use of spray-dried SDs containing FA as a feasible oral drug delivery carrier to provide an immediate release of FA, being an attractive alternative for treating arterial thrombotic events.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no declarations of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CAPES/Brazil and Fundação Araucária/Brazil for financial support. They would also like to thank the Complexo de Laboratórios Multiusuários, which is a multi-user laboratory of analytical equipments and facilities at State University of Ponta Grossa, for providing infrastructure, constant support and encouragement.

REFERENCES

1. Savjani K T, Gajjar A K, Savjani J K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm* 2012;2012:1–10.
2. Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;50:47–60.
3. Vasconcelos T, Sarmento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today* 2007;12:1068–1075.
4. Dhillon B, Goyal N K, Malviya R, Sharma P K. Poorly water soluble drugs: change in solubility for improved dissolution characteristics: A review. *Global Journal of Pharmacology* 2014;8(1):26–35.
5. Huang Y, Dai W-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharm Sin B* 2014;4(1):18–25.
6. Van den Mooter G, Augustijns P, Bleton N. Physicochemical characterization of solid dispersions of temazepam with polyethylene glycol 6000 and PVP K30. *Int J Pharm* 1998;164:67–80.
7. Patel D B. Comparative evaluation of different carriers to enhance solubility and dissolution of poor water soluble drug. *Int J Pharm Bio Sci* 2014;5(4):463–471.
8. Chen Y, Zhang G G, Neilly J. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing Pluronic F-68. *Int J Pharm* 2004;286:69-80.
9. Vyas V, Sancheti P, Karekar P. Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. *Acta Pharm* 2009;59:453–461.

10. Senthilkumar K L, Sirisha Y. Enhancement of dissolution rate studies on solid dispersion of aceclofenac. *Int J Pharm Bio Sci* 2011;2(2):70–76.
11. Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C. Characterization of inclusion complex of *trans*-ferulic and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Food Chem* 2011;124:1069–1075.
12. Itagaki S, Kurokawa T, Nakata C, Saito Y, Oikawa S, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem* 2009;114:466–471.
13. Murakami A, Nakamura Y, Koshimizu K, Takahashi D, Matsumoto K, Hagihara K, Taniguchi H, Nomura E, Hosoda A, Tsuno T, Maruta Y, Kim H W, Kawabata K, Ohigashi H. FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid. *Cancer Lett* 2002;180(2):121–129.
14. Ou S, Kwok K-C. Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and application. *J. Sci. Food Agr.* 2004;84:1261–1269.
15. Soobrattee M A, Neergheen V S, Luximon-Ramma A, Aruomab O, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents. Mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005;579:200–213.
16. Merlin J P J, Prasad N R, Shibli S M A, Sebeela M. Ferulic acid loaded Poly-*d,l*-lactide-co-glycolide nanoparticles: Systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line *in vitro*. *Biomed Prev Nutr* 2012;2:69–76.
17. Anselmi C, Centini M, Ricci M, Buonocore A, Granata P, Tsuno T, Facino R M. Analytical characterization of a ferulic acid/gama-cyclodextrin inclusion complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006;40:875–881.
18. Anselmi C, Centini M, Maggiore M, Gaggelli N, Andreassi M, Buonocore A, Beretta G, Facino R M. Non-covalent inclusion of ferulic acid with alfa-cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *J Pharmaceut Biomed* 2008;46:645–652.
19. Yu D-G, Yang J-M, Branford-White C, Lu P, Zhang L, Zhu L-M. Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *Int. J. Pharm.* 2010;400:158–164.
20. Paradkar A, Ambike A A, Jadhav B K, Mahadik K R. Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying. *Int. J. Pharm.* 2004; 271(1-2):281-286.

21. Weuts I, Kempen D, Verreck G, Decorte A, Heymans K. Study of the physicochemical properties and stability of solid dispersions of loperamide and PEG 6000 prepared by spray drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005;59(1):119-126.
22. ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
23. Nadal J M, Toledo M G, Pupo Y M, de Paula J P, Farago P V, Zanin S M W. A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency. *J Anal Methods Chem* 2015;2015:1–10.
24. Khan K A. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* 1975;27(1):48–49.
25. Freitag G. Guidelines on dissolution profile comparison. *Drug Inf J* 2001; 35(3):865–874.
26. Beck R C R, Pohlmann A R, Benvenutti E V, Costa T D, Guterres S S. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological characterization, *in vitro* release and *in vivo* gastrointestinal tolerance. *J. Braz. Chem. Soc.* 2005;16(6):1233–1240.
27. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26(9-10):1231–1237.
28. Chan S-Y, Chung Y-Y, Cheah X-Z, Tan E Y-L, Quah J. The characterization and dissolution performances of spray dried solid dispersion of ketoprofen in hydrophilic carriers. *AJPS* 2015;10:372–385.
29. Singh S, Dixit D. A Review on spray drying: emerging technology in food industry. *IJAER* 2014;4(1):1–8.
30. Jørgensen A C, Torstenson A S. Humid storage conditions increase the dissolution rate of diazepam from solid dispersions prepared by melt agglomeration. *Pharm Dev Technol* 2008;13:187–195.
31. Kanaujia P, Lau G, Ng W K, Widjaja E, Schreyer M, Hanefeld A, Fischbach M, Saal C, Maio M, Tan R B. Investigating the effect of moisture protection on solid-state stability and dissolution of fenofibrate and ketoconazole solid dispersions using PXRD, HSDSC and Raman microscopy. *Drug Dev Ind Pharm* 2011;37:1026–1035.
32. Callahan J C, Cleary G W, Elefant M, Kaplan G, Kensler T, Nash R A. Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Dev Ind Pharm* 1982;8:355–369.

33. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, Paolino D, Bonina F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm.* 2000;199:39–47.
34. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble. *Drug Discov Today* 2007; 12(23-24):1068–1075.
35. Murtaza G, Khan S A, Najam-ul-Haq M, Hussain I. Comparative evaluation of various solubility enhancement strategies for furosemide. *Pak J Pharm Sci* 2014;27(4):963–73.
36. Ohara T, Kitamura S, Kitagawa T, Terada K. Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Int. J. Pharm.* 2005;302:95–102.
37. Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;50:47–60.
38. Kabanov K V, Batrakova E V, Alakhov V Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Contr. Rel.* 2002;82: 189–212.
39. Jones M C, Leroux J C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999;48:101–111.
40. Chen Y, Zhang G G Z, Neilly J, Marsh K, Mawhinney D, Sanzgiri Y D. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing pluronic F-68. *Int. J. Pharm.* 2004;286:69–80.
41. Sharma A, Jain C P. Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with PVP K30. *Res Pharm Sci* 2010;5(1):49–56.
42. Newman A. *Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions*. New York, NY: John Wiley & Sons; 2015:161–162.
43. Guedes F L, de Oliveira B G, Hernandez M Z, De Simone C A, Veiga F J B, de Lima M C A, Pitta I R, Galdino S L, Neto P J R. Solid dispersions of imidazolidinedione by PEG and PVP polymers with potential antischistosomal activities. *AAPS PharmSciTech* 2011;12(1):401–410.
44. Bhise S D. Ternary solid dispersions of fenofibrate with poloxamer 188 and TPGS for enhancement of solubility and bioavailability. *IJRPBS* 2011;2(2): 583–595.
45. Brittain H B. X-ray powder diffraction of pharmaceutical materials. *Am. Pharmaceut. Rev.* 2002;5(1):74–80.

46. Bogdanova S, Pajeva I, Nikolova P, Tsakovska I, Müller B. Interactions of poly(vinylpyrrolidone) with ibuprofen and naproxen: Experimental and modeling studie. *Pharmaceut Res* 2005;22(5):806–815.
47. Frizon F, Eloy J O, Donaduzzi C M, Mitsui M L, Marchetti J M. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods. *Powder Technol* 2013;235:532–539.
48. Hatakeyama T, Quinn F X. *Thermal Analysis; Fundamentals and Applications to Polymer Science*. New York, NY: John Wiley & Sons; 1994.
49. Pielichowski K, Njuguna J. *Thermal degradation of polymeric materials*. Shrewsbury: RAPRA; 2005.
50. Chen Y, Liu C, Chen Z, Su C, Hageman M, Hussain M, Haskell R, Stefanski K, Qian F. Drug–polymer–water interaction and its implication for the dissolution performance of amorphous solid dispersions. *Mol. Pharmaceutics*. 2015;12:576–589.
51. Kalia A, Khurana S, Bedi N. Formulation and evaluation of mouth dissolving tablets of oxcarbazepine. *Int J Pharm Pharm Sci* 2009;1(1):12–23.
52. Raffin R P, Colomé L M, Pohlmann A R, Guterres S S. Preparation, characterization, and *in vivo* anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;63(2):198–204.
53. Mendes J B E, Riekes M K, de Oliveira V M, Michel M D, Stulzer H K, Khalil N M, Zawadzki S F, Mainardes R M, Farago P V. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:1–13.
54. Ruiz M E, Volonté M G. Biopharmaceutical relevance of dissolution profile comparison: proposal of a combined approach. *Dissolut Technol* 2014;Feb:32–43.
55. Peng H, Xiong H, Li J, Xie M, Liu Y, Bai C, Chen L. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chem* 2010;121:23–28.
56. Patel N, Chotai N, Patel J, Soni T, Desai J, Patel R. Comparison of *in vitro* dissolution profiles of oxcarbazepine-HP β -CD tablet formulations with marketed oxcarbazepine tablets. *Dissolut Technol* 2008;Nov:28–34.
57. Wilkowska A, Ambroziak W, Czyżowska A, Adamiec J. Effect of microencapsulation by spray-drying and freeze-drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2016;66(1):0–0.

58. Steinhubl S R, Berger P B, Mann III J T. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. JAMA 2002;288(19):2411–2420.
59. Zhang P-X, Lin H, Qu C, Tang Y-P, Li N-G, Kai J, Shang G, Li B, Zhang L, Yan H, Liu P, Duan J-A. Design, synthesis, and *in vitro* antiplatelet aggregation activities of ferulic acid derivatives. J Chem 2015;2015:1–7.
60. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. Semin Thromb Hemost 1997; 23(4):349–356.

ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 017/2013

Protocolo UEPG – 15981/2013

Título – “Protocolo de pesquisa “Avaliação in vivo do potencial hipolipemiante e antitrombótico de dispersões sólidas e de micropartículas poliméricas contendo ácido feúlico””.

Interessado – *Prof. Dr. Paulo Vítor Farago*

Data de Entrada – 03/09/2013

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 03/09/2013 a 02/09/2015

Considerações

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação pela aprovação, por dois anos, do uso de 98 (noventa e oito) animais
- APROVADO.

Atenciosamente,

Professor Dr. Giovanni Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaíras,
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264